



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Pretratamiento con agua líquida caliente de raquis de banano

Juan Carlos Quintana Marín

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Procesos y Energía
Medellín, Colombia

2012

Pretratamiento con agua líquida caliente de raquis de banano

Liquid hot water pretreatment of banana rachis

Juan Carlos Quintana Marín

jcquintam@unal.edu.co

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ingeniería Química

Directora:

Ph.D. Ángela Adriana Ruiz Colorado

Línea de Investigación:

Producción de bioetanol

Grupo de Investigación:

Bioprocesos y Flujos Reactivos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Minas, Departamento de Procesos y Energía

Medellín, Colombia

2012

A mis padres, hermana y hermano

Agradecimientos

La connotación que los humanos somos seres sociales por naturaleza, implica la contribución recíproca al desarrollo personal y es el noble sentimiento de gratitud, la mejor retribución a esas intenciones y acciones.

Las principales pero no las únicas personas e instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo y a las que manifiesto mi gratitud son:

La profesora Ángela por la revisión y retroalimentación de este texto. Además por los consejos de vida.

Al profesor Nathan S. Mosier por permitirme trabajar en el Laboratorio de Ingeniería de los Recursos Renovables (LORRE por sus siglas en Inglés) de Purdue University, bajo su ejemplar, amable y dispuesta orientación.

A Linda Liu también del LORRE por el apoyo con los análisis HPLC.

Al grupo Bioprocesos y Flujos Reactivos por la amistad. También los aportes y discusión, especialmente en las reuniones semanales.

A Colciencias y la Alcaldía de Medellín por la financiación a través de los programas Jóvenes Investigadores 2010 y Enlaza Mundos, respectivamente.

A mis padres, hermana y hermano quienes siempre le han apostado a mi formación profesional y confían cuando emprendo un proyecto de este tipo. Además me motivan constantemente anhelando el logro de los objetivos.

Resumen

Los residuos generados después de la producción de banano representan un material celulósico abundante que tiene potencial para ser usado en la producción de biocombustibles celulósicos. La conversión eficiente de biomasa lignocelulósica en azúcares monoméricos requiere reducción del tamaño de partícula, pretratamiento e hidrólisis enzimática. El agua líquida caliente (ALC) es un pretratamiento hidrotérmico efectivo con potencial en aplicaciones industriales que debe ser optimizado en términos de la temperatura, tiempo de reacción, tamaño de partícula de la biomasa y la relación agua: sólidos que puede variar dependiendo de las características de la lignocelulosa. En este trabajo se optimizó el pretratamiento con agua líquida caliente de raquis de banano para temperaturas entre 180 and 220°C, tiempos entre 0 y 60min, dos rangos de tamaño de partículas (<0.42 mm y 2.83 a 6.35 mm) y carga de sólidos de 5 y 15% peso seco (p/p). El mayor rendimiento de glucosa (82%) se evidenció a 220°C durante 20 min. Mientras estas condiciones reflejan la solubilización de casi toda la hemicelulosa, el rendimiento a xilosa y arabinosa decreció por la presencia de compuestos alcalinos en el raquis fresco, los cuales catalizaron la degradación a sustancias húmicas. Se propuso un modelo con dependencia de la temperatura, tipo Arrhenius, el cual describe acertadamente la formación en serie de oligómeros.

Palabras clave: Raquis de banano, hidrólisis enzimática de celulosa, pretratamiento.

Abstract

Banana agricultural waste represents a regionally-specific and abundant cellulosic material that has potential as a feedstock for producing cellulosic biofuels. Efficient conversion of lignocellulosic biomass into monomeric sugars requires particle size reduction, pretreatment, and enzymatic hydrolysis. Liquid hot water (LHW) is an effective hydrothermal pretreatment process with potential for industrial application that must be optimized in terms of the temperature, reaction time, particle size of biomass, and water:solids ratio that can vary depending upon the characteristics of the lignocellulose. We present the optimization of LHW pretreatment of banan rachis for temperatures between 180 and 220°C, at times between 0 and 60min, two particle size ranges (<0.42 mm and 2.83 to 6.35 mm), and solid loadings of 5 and 15% dry matter (w/w). The highest

saccharification yields of glucose (82%) occurred after pretreatment at 220°C for 20 min. While these conditions resulted in extraction of nearly all of the hemicellulose, the yield of xylose and arabinose was lowered by the presence of alkali in the raw material which catalyzed the degradation. A model was proposed in order to elucidate the serial formation of oligomers and subsequent monomers but mostly humins.

Keywords: Banana rachis, Cellulose enzymatic hydrolysis and Pretreatment.

Contenido

1. Introducción	13
2. Marco Teórico.....	16
2.1 Caracterización biomasa lignocelulósica	16
2.1.1 Celulosa	17
2.1.2 Hemicelulosa	17
2.1.3 Lignina.....	18
2.2 Biorrefinerías.....	18
2.3 Pretratamientos sobre biomasa lignocelulósica.....	19
2.3.1 Pretratamientos con pH neutro	20
2.3.2 Pretratamiento con pH controlado.....	23
2.3.3 Pretratamientos ácido-básicos.....	23
2.4 Hidrólisis enzimática.....	27
2.5 Mecanismos de reacción de la biomasa lignocelulósica en procesos hidrotérmicos	28
2.5.1 Rutas de conversión hidrotérmica de la celulosa	28
2.5.2 Rutas de conversión hidrotérmica de la hemicelulosa.....	30
2.5.3 Rutas de conversión hidrotérmica de la lignina	32
2.6 Modelos cinéticos de la solubilización de polisacáridos.....	33
3. Materiales y Métodos	43
3.1 Raquis de banano	43
3.2 Composición química	43
3.3 Pretratamiento con agua líquida caliente.....	44
3.4 Hidrólisis enzimática.....	46
3.5 Análisis HPLC	46
3.6 Modelado y simulación del pretratamiento con agua líquida caliente	47
4. Resultados.....	51
4.1 Composición química	51
4.2 Diseño de experimentos.....	53
4.3 Optimización	56
4.4 Efecto del pretratamiento	62
4.5 Digestibilidad enzimática	67
4.6 Ajuste del modelo.....	70
5. Conclusiones y Recomendaciones.....	81
5.1 Conclusiones.....	81
5.2 Recomendaciones.....	82

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2-1: Composición relativa del sólido remanente como función del pH en cada pretratamiento (Carvalho et al., 2008).	24
Figura 2-2: Conversión hidrotérmica de celulosa. (Castro V. et al., 2008)	30
Figura 2-3: Ruta de deshidratación de xilosa catalizada por protones. Lu, 2008.	31
Figura 2-4: Deacetilación de hemicelulosa en procesos hidrotérmicos. (Castro V. et al., 2008).	32
Figura 2-5: Conversión hidrotérmica de la lignina en ausencia de oxígeno. (Castro V. et al., 2008).	33
Figura 3-1: Tamaño de partícula diseño experimental.	45
Figura 3-2: Reactor batch para pretratamiento con agua caliente.	46
Figura 3-3: Diagrama de proceso.	47
Figura 3-4: Ruta de solubilización de polisacáridos 1.	47
Figura 3-5: Ruta de solubilización de polisacáridos 2.	50
Figura 4-1: Prueba de rangos múltiples (LSD) rendimiento glucosa hidrólisis enzimática.	54
Figura 4-2: Prueba de rangos múltiples (LSD) rendimiento xilosa hidrólisis enzimática.	55
Figura 4-3: Prueba de rangos múltiples (LSD) rendimiento arabinosa hidrólisis enzimática.	55
Figura 4-4: Prueba de rangos múltiples (LSD) rendimiento xilo- y arabino-oligo. Después del pretratamiento ALC.	56
Figura 4-5: Superficie respuesta Rendimiento glucosa vs. Temperatura y tiempo.	57
Figura 4-6: Superficie respuesta Rendimiento arabinosa vs. Temperatura y tiempo.	58
Figura 4-7: Superficie respuesta Rendimiento xilosa vs. Temperatura y tiempo.	59
Figura 4-8: Superficie respuesta Rendimiento xilooligómeros vs. Temperatura y tiempo.	59
Figura 4-9: Superficie respuesta Rendimiento arabinooligómeros vs. Temperatura y tiempo.	60
Figura 4-10: Balance total punto óptimo, 220°C y 30min por triplicado.	62
Figura 4-11: pH a temperatura ambiente después del pretratamiento.	64
Figura 4-12: Concentración ácido acético después del pretratamiento.	64
Figura 4-13: Solubilización de hemicelulosa en oligómeros.	65
Figura 4-14: Solubilización de glucano en monómeros y oligómeros.	66
Figura 4-15: Rendimiento total de azúcares después del pretratamiento y la hidrólisis enzimática.	68

Figura 4-16: Composición del sólido remanente después del pretratamiento.	70
Figura 4-17: Correlación perfiles de concentración solubilización xilano, modelo 1	72
Figura 4-18: Correlación perfiles de concentración solubilización arabano, modelo 1. ..	73
Figura 4-19: Color muestras pretratadas Indicativo de presencia de sustancias húmicas.	75
Figura 4-20: Velocidad de degradación de xilosa vs. pH (Lu, 2008).	75
Figura 4-21: Correlación perfiles de concentración solubilización arabano, modelo 2. ..	78
Figura 4-22: Correlación perfiles de concentración solubilización arabano, cada temperatura por separado.	80
Figura 5-1: Curvas de calibración HPLC.....	84

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Condiciones de operación usadas en hidrotratamiento de RLC (Mittal, 2006).	22
Tabla 2-2: Modelos de degradación de polisacáridos de materiales lignocelulósicos y almidón reportados en la literatura.	36
Tabla 4-1: Composición raquis de banano sin extractivos.....	52
Tabla 4-2: Composición del raquis de banano.....	52
Tabla 4-3: Maderas y residuos agroindustriales comunes. Tomada de (P. Kumar et al., 2009).	52
Tabla 4-4: Análisis de varianza para rendimiento de glucosa después del pretratamiento ALC y la hidrólisis enzimática.....	53
Tabla 4-5: Estimación parámetros cinéticos para la solubilización de xilano, modelo 1. .	72
Tabla 4-6: Estimación parámetros cinéticos para la solubilización de arabano, modelo 1.	73
Tabla 4-7: Estimación parámetros cinéticos para la solubilización de arabano, modelo 2.	77
Tabla 4-8: Coeficiente de correlación.	79
Tabla 4-9: Estimación parámetros cinéticos para la solubilización de arabano, cada temperatura por separado.....	80

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
E_a	Energía de activación	$\frac{\text{J}}{\text{mol}}$	
k_{oi}	Factor preexponencial	$\frac{1}{\text{mol}^{-n_i} \text{min}^{-1}}$	
k	Constante cinética	$\frac{1}{\text{min}^{-1}}$	
R	Constante de los gases ideales	$\frac{\text{J}}{\text{molK}}$	8.314
T	Temperatura	K	
t	tiempo	min	
X	Concentración monómero	$\frac{\text{g}}{\text{L}}$	
X_n	Concentración polímero	$\frac{\text{g}}{\text{L}}$	
XO	Concentración oligómero	$\frac{\text{g}}{\text{L}}$	

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
φ	Rendimiento fraccional instantáneo	1	$\frac{[X]_{t=t}}{[X_n]_{t=0} * \frac{PM_{monómero}}{PM_{polímero}} + [X]_{t=0}}$

Subíndices

Subíndice	Término
i	Paso en el mecanismo de reacción
n	Polímero
t	tiempo

Superíndices

Superíndice	Término
+	Protón

Abreviaturas

Abreviatura	Término
--------------------	----------------

<i>ALC</i>	Pretratamiento con agua líquida caliente
------------	--

<i>RLC</i>	Residuos Lignocelulósicos
------------	---------------------------

1.Introducción

El inminente agotamiento y el incremento en la demanda de los combustibles fósiles ha motivado la búsqueda de nuevos sustituyentes como la producción de etanol a partir de cultivos energéticos y residuos lignocelulósicos (RLC). Estos materiales son renovables y permiten un balance favorable de CO₂ cuando los biocombustibles y los combustibles fósiles son comparados. Además los RLC son económicos y no compiten como materia prima para otros procesos industriales, pero son muy contaminantes cuando se dejan en el campo para su descomposición después de la cosecha y/o la poda (Sánchez & Cardona, 2008; Velásquez-Arredondo, Ruiz-Colorado, & De Oliveira junior, 2010; Zhang, Whistler, BeMiller, & Hamaker, 2005).

La bioconversión de residuos locales en etanol puede favorecer el desarrollo de las economías rurales ofreciendo empleo y suministrando una fuente local de combustible. Este plan es aplicable en regiones tropicales como Colombia donde es cultivado el banano y cuya producción está alrededor de 250 mil toneladas año. A nivel mundial son generadas 550 millones de toneladas de RLC (considerando una relación raquis/fruto=1 y pseudotallo/fruto=5, teniendo en cuenta la producción mundial de banano reportada por la FAO 2012) después de la producción de la fruta, lo cual corresponde al fin del ciclo de vida de la planta ya que esta es cortada y reemplazada por los nuevos brotes o retoños (Tock, Lai, Lee, Tan, & Bhatia, 2010).

Parte del fruto de rechazo así como de la planta cortada, compuesta de pseudotallo, raquis y hojas, son generalmente dejados en el campo para su descomposición. Esto ocasiona esparcimiento de enfermedades y contaminación de efluentes. Los usos que se han propuesto para los residuos de fruta han sido alimentación animal, compostaje y producción de harina comestible y vacunas (Mestel, 2012; Zhang et al., 2005) mientras que la fracción lignocelulósica ha sido procesada para producir fibras útiles en la

manufactura de paneles de fibra y en el sector textil y del papel (Quintana, Velásquez, Betancourt, & Gañán, 2009; Tock et al., 2010; Zuluaga, Putaux, Restrepo, Mondragon, & Gañán, 2007). Solamente en los últimos años han sido evaluados como materiales energéticos a través de su uso en biodigestores y en la producción de etanol (Tock et al., 2010; Velásquez-Arredondo et al., 2010). Con respecto a la producción de etanol, el almidón en la fruta es relativamente fácil de transformar por enzimas amilolíticas mientras que los desechos derivados de la planta necesitan ser pretratados antes de la hidrólisis enzimática (Velásquez-Arredondo et al., 2010).

Un estudio sobre potencial energético de residuos agroindustriales revela que los más promisorios en Colombia son aquellos derivados de la palma de aceite, caña de azúcar, café, maíz, arroz, banano y plátano. Del banano y plátano se enfatiza en el pseudotallo y raquis (Escalante-Hernández, Orduz-Prada, Zapata-Lesmes, Cardona-Ruiz, & Duarte-Ortega, n.d.). El raquis tiene una ventaja adicional en comparación con los demás desechos y es que se encuentra disponible y/o concentrado debido a que junto con el fruto, es llevado a las zonas de empaque donde es abandonado.

Dadas las diferencias en la composición y complejidad estructural de cada parte de la planta el grupo de investigación Bioprocesos y Flujos Reactivos de la Universidad Nacional, Sede Medellín está optimizando las rutas de bioconversión de ellas individualmente. Un estudio preliminar considerando como variables de proceso, dos tiempos y temperaturas, sugirió que el pretratamiento con ALC es mejor para raquis de banano, en comparación con explosión a vapor.

Aunque el estudio preliminar indicó que el pretratamiento con ALC es el más conveniente para raquis, se hace necesario entender el efecto de variables como el tiempo, temperatura, pH y carga de sólidos sobre el rendimiento de azúcares (Hosseini & Shah, 2009a). En este trabajo se evalúan estas variables en el pretratamiento con ALC sobre raquis de banano y la posterior hidrólisis enzimática con el fin de encontrar la mayor producción de azúcares, entender los mecanismos de reacción por los cuales se generan degradación de azúcares y consecuentemente, la generación de otros compuestos no deseados y desarrollar un modelo matemático para predecir la solubilización de polisacáridos a partir de los valores que cada variable toma durante el pretratamiento.

El modelo propuesto predice acertadamente la formación de oligómeros, monómeros y productos de degradación (sustancias húmicas).

Objetivo General

Generar un modelo matemático que describa la producción de azúcares y compuestos de degradación en el pretratamiento de agua líquida caliente de raquis de banano.

Objetivos específicos

- Caracterizar los polisacáridos presentes en el raquis de banano.
- Establecer las ecuaciones asociadas a la producción de azúcares y compuestos de degradación durante el pretratamiento hidrotérmico de raquis de banano.
- Determinar los parámetros del modelo a partir del ajuste con datos experimentales.
- Verificar la efectividad del pretratamiento a partir del rendimiento global de azúcares en procesos enzimáticos.

2.Marco Teórico

En el marco de las biorrefinerías, esta revisión plantea la composición de la biomasa y su procesamiento haciendo énfasis en las tecnologías más promisorias de pretratamiento y su modo de acción desde el punto de vista mecánico y químico.

Por último se plantean los mecanismos y ecuaciones cinéticas propuestas para describir la autohidrólisis o solubilización de la hemicelulosa que es el principio del pretratamiento con ALC.

2.1 Caracterización biomasa lignocelulósica

Los materiales lignocelulósicos son la biomasa renovable más abundante con una producción anual de 1×10^{10} MT (Sánchez & Cardona, 2008) y está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. La hemicelulosa y celulosa son polímeros de azúcares que pueden ser aprovechados en procesos fermentativos para producir otros compuestos de valor agregado. Sin embargo, dadas sus estructuras, la hemicelulosa es tratada a condiciones ácida o alcalinas poco severas en comparación con la celulosa que exhibe una formación cristalina. A continuación se presentan los detalles en la estructura química de cada una de las fracciones de la biomasa lignocelulósica para el entendimiento posterior de la acción de los pretratamientos propuestos en la literatura con el propósito de modificarlas.

Las siguientes definiciones fueron tomadas textualmente del trabajo de Kim et al. (2008) en el que se muestra al final un glosario sobre los términos correspondientes a los componentes de los materiales lignocelulósicos y cuya finalidad es facilitar el entendimiento y evitar confusiones entre la comunidad científica.

2.1.1 Celulosa

Polímero lineal de glucosa β 1-4 glucosa que se encuentra en las paredes de las células vegetales y otra clase de células y bacterias. La celulosa es un polímero recto que forma cristales naturales a través de interacciones Van Der Waals y puentes de hidrógeno entre las caras planas de múltiples cadenas de celulosa. Esta estructura macromolecular le da a la celulosa rigidez y resistencia a la hidrólisis (es difícil para el agua penetrar fácilmente a la estructura cristalina).

2.1.2 Hemicelulosa

Polímero altamente ramificado compuesto principalmente de xilosa y arabinosa, con pequeñas cantidades de galactosa y glucosa presentes en las paredes de las células vegetales. La hemicelulosa está sustituida con ésteres de ácido acético y glucorónico. Ésta actúa como fracción cementante en las paredes de las células de las plantas que mantienen las microfibras cristalinas de celulosa en su lugar y es hidrolizada relativamente fácil en comparación con la celulosa, debido a su estructura amorfa altamente ramificada.

- Xilano

Se refiere a la forma anhidra de la xilosa presente en la hemicelulosa. Es anhidra porque tiene una molécula de agua (18 g/mol) menos debido a la reacción de condensación para formar el polímero $C_5H_8O_4$, peso molecular = 132 g per g-mol. Este es un término de conveniencia para las consideraciones del balance de masa que no reflejan la complejidad de la hemicelulosa ampliamente sustituida. La medición del xilano se lleva a cabo por la hidrólisis de la biomasa con ácido sulfúrico, midiendo la xilosa resultante con HPLC, y corrigiendo la masa final con el agua agregada durante la hidrólisis. Xilosa y galactosa en la misma solución, son cuantificadas utilizando el mismo pico en el cromatograma ya que son retenidos al mismo tiempo y por tanto se reportan combinados.

- Arabano

Se refiere a la forma anhidra de la arabinosa, presente en la hemicelulosa. Tiene una molécula de agua (18 g/mol) menos que la arabinosa debido a la reacción de condensación para formar el polímero $C_5H_8O_4$, peso molecular = 132g por g-mol. Este es un término de conveniencia para las consideraciones del balance de masa que no reflejan la complejidad de la hemicelulosa ampliamente sustituida. La medición del arabano se lleva a cabo por la hidrólisis de la biomasa con ácido sulfúrico, midiendo la arabinosa resultante con HPLC, y corrigiendo la masa final con el agua agregada durante la hidrólisis.

- Grupos acetilo

Se refiere a la forma anhidra del ácido acético como sustituyente de la hemicelulosa a través de un enlace éster. CH_3COOH , de peso molecular 42g por g-mol. La medición de los grupos acetil se desarrolla a través de la hidrólisis de la biomasa con ácido sulfúrico, midiendo el ácido acético resultante con HPLC, y finalmente corrigiendo la masa final por el agua agregada durante la hidrólisis (18 g/mol).

2.1.3 Lignina

Es un polímero altamente complejo y ramificado de unidades de fenilpropanos. Se encuentra en la pared celular secundaria de las plantas y actúa como un sello para prevenir los ataques microbianos de las células e incrementar la resistencia y rigidez o firmeza de la pared celular. La lignina es depositada en la última etapa de crecimiento de la planta. La resistencia de la lignina previene alguna elongación de la célula después de depositada. Las células de las plantas altamente lignificadas se encuentran en los sectores más maduros de la planta responsables del soporte estructural.

2.2 Biorrefinerías

El concepto de biorrefinería involucra plantas de procesamiento integradas y diversificadas donde la biomasa lignocelulósica es transformada en una amplia variedad de productos de valor agregado de la misma manera que las refinerías de petróleo.

Las plataformas de biorrefinerías dependen en gran medida del material a tratar y se clasifican en bioquímicas y termoquímicas. Las primeras se basan en la producción de azúcares y las termoquímicas en la generación de gas de síntesis, biogases o productos ricos en enlaces de carbono.

Este trabajo se basa en la plataforma bioquímica la cual involucra en primera instancia preparación de la materia prima utilizando molienda y pretratamientos, conversión de la biomasa en azúcares y otros compuestos fermentables a través de catalizadores químicos y/o biológicos y por último la etapa de fermentación en la cual se produce etanol y otros combustibles (Carvalho, Duarte, & Gírio, 2008) . A la vez, el enfoque es la primera etapa o pretratamiento debido a que esta se considera como la más costosa (Hosseini & Shah, 2009a) y además afecta los procesos posteriores.

2.3 Pretratamientos sobre biomasa lignocelulósica

El aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica para la generación de productos de valor agregado a partir de sus fracciones constituyentes como la hemicelulosa y celulosa, requiere en primera instancia la eliminación de las barreras que dificultan el acceso de catalizadores químicos o biológicos que contribuyen a su transformación a la vez que es necesario disminuir la recalcitrancia o alteración de las estructuras cristalinas de la fracción de interés con el fin de obtener una mayor velocidad de reacción y mejores rendimientos. Además es deseable que los carbohidratos no se degraden o se formen otros productos que puedan inhibir la acción de las enzimas o los microorganismos fermentadores.

El fraccionamiento de los RLC y la utilización de cada componente por separado es la actual filosofía de las biorrefinerías de biomasa. Sin embargo, se tiene el problema que cada componente estructural (celulosa, hemicelulosa y lignina) no puede ser aislado simultáneamente y por lo general ocurre la solubilización y dependiendo de las condiciones o severidad, la paralela o posterior degradación de alguna de ellas.

Las maderas y residuos agrícolas tienen diferente composición y la formación y deposición de cada una de sus fracciones en las paredes de las células varía por la

especie, condiciones ambientales, daños por poda, humedad, radiación UV, plagas. Dada la diferencia en composición y la complejidad estructural de cada planta y sus tejidos, es primordial someterlos a diferentes rutas de bioconversión y condiciones de operación con el fin de encontrar el mejor balance entre rendimiento y economía.

2.3.1 Pretratamientos con pH neutro

- Explosión a vapor

En este pretratamiento la biomasa se pone en contacto con vapor de agua saturado a temperaturas que oscilan entre 160 y 260°C por períodos de segundos o varios minutos después de los cuales, este es liberado súbitamente a través de una válvula de alivio que hace que el vapor absorbido por el material lignocelulósico se expanda tratando de igualar la presión de los alrededores.

Durante la explosión a vapor se dan reacciones de pirólisis y de hidrólisis dependientes principalmente del tiempo y la temperatura. Además de las reacciones, este pretratamiento tiene efectos mecánicos en el sentido que la expansión genera fuerzas que desagregan y rompen las fibras.

El concepto de accesibilidad involucra la separación en sus fracciones con razonable grado de pureza para ser aprovechadas en la producción de etanol como es el caso de la celulosa y producción de químicos utilizados en la medicina, construcción de materiales y aditivos en alimentación, tal como ocurre con la hemicelulosa y lignina (Wang, Jiang, Xu, & Sun, 2009).

Con el fin de obtener un sólido rico en celulosa, es necesario implementar otra clase de pretratamientos además de la explosión a vapor con la finalidad de solubilizar la lignina y la hemicelulosa degradada (sustancias húmicas). Uno de estos tratamientos consiste en poner en contacto la biomasa ya alterada por explosión a vapor, es decir, una biomasa con mayor porosidad, con una solución de sodio 1 M a 30°C y durante tres horas (L. Kumar, Chandra, Chung, & Saddler, 2010; Wang et al., 2009).

Además del uso de base, también se ha encontrado que antes del proceso de expansión a vapor, la biomasa lignocelulósica es impregnada con ácidos (Cara et al., 2008; S. B.

Kim & Lee, 2002; Zimbardi et al., 2007). Estos ácidos junto con el comportamiento ácido del agua a altas temperaturas (aumento del pKa) favorece la solubilización de hemicelulosa y degradación de xilosa.

En general, la cantidad de agua como resultado de la condensación del vapor después de la descompresión no representa una dilución excesiva de los azúcares solubilizados.

- Agua líquida caliente o agua caliente comprimida

Con el objetivo de obtener azúcares, uno de los tratamientos de más interés actual es el de agua caliente comprimida el cual ha sido analizado desde el punto de vista del desempeño, de los mecanismos de reacción y el desarrollo de modelos cinéticos.

Este pretratamiento es similar al de explosión a vapor, sin embargo, a diferencia de este la biomasa está en medio líquido y la expansión es reemplazada por un enfriamiento controlado en el que se mantiene el equilibrio líquido vapor o saturación y por ende, líquido todo el tiempo. Es por esta razón que se recomienda llenar con la mezcla biomasa agua más de un 75% del volumen del reactor.

Durante este pretratamiento se usan temperaturas superiores a 150°C pero inferiores a la crítica del agua. A estas condiciones el agua permanece en fase acuosa y se favorece la deshidratación y reacciones de condensación retro-aldol debido al cambio en las propiedades del agua con respecto a la temperatura ambiente como constante dieléctrica baja y alto producto iónico. Es decir, el agua caliente subcrítica puede actuar como catalizador ácido o básico para reacciones de hidrólisis de enlaces éter y éster, además actúa como solvente y reactante (Wu, Fu, Giles, & Bartle, 2008).

La reacción hidrotérmica de los polisacáridos como la celulosa y hemicelulosa ricos en enlaces tipo éter y éster, lleva a la producción de oligosacáridos, monómeros e isómeros, además de productos de degradación como furfurales, fenoles y ácidos carboxílicos (Castro V., Rodríguez V., & Díaz V., 2008). La alteración de la biomasa y la conversión a azúcares está relacionado con el tipo de material, la temperatura (Y. Kim, Mosier, & Ladisch, 2008), tamaño de partícula (Zeng, Mosier, Huang, & Sherman, 2007a), humedad y tiempo (Hosseini & Shah, 2009a).

Dado que la hemicelulosa es más fácil de hidrolizar, se han propuesto dos etapas de hidrólisis utilizando agua caliente comprimida para aumentar la conversión de la biomasa a azúcares. Una primera etapa a temperaturas entre 180 y 200°C en el que la hemicelulosa es solubilizada seguida de un incremento de temperatura más arriba de 230°C para recuperar la glucosa del sólido residual (Wu et al., 2008); sin embargo, en los últimos días, las investigaciones han desarrollado solamente la primera y se han enfocado en la optimización de la hidrólisis enzimática de la celulosa como proceso subsecuente (Li et al., 2010).

Además de la temperatura durante el pretratamiento con agua caliente, se ha reportado condiciones de operación que varían entre 6-20 % p/p para carga de sólidos (Dien et al., 2008; Y. Kim, Mosier, & Ladisch, 2008), tamaño de partículas desde 0.420 mm (Y. Kim, Mosier, & Ladisch, 2008) hasta 10 mm (Cara et al., 2008) e incluso tamaños poco usuales hasta de 2 cm aplicados especialmente a chips de madera debido a que esta es más difícil fraccionarla en comparación con materiales herbáceos (Mittal, Chatterjee, Scott, & Amidon, 2009a). Respecto a los tiempos, oscilan entre 5 y 20 min (Cara et al., 2008; Y. Kim, Mosier, & Ladisch, 2008). La Tabla 2-1 presenta un rango completo de condiciones y materiales.

Tabla 2-1: Condiciones de operación usadas en hidrotratamiento de RLC (Mittal, 2006).

Biomasa	Tiempo precalentamiento (min)	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción (min)	Tamaño de partícula (mm)	Relación líquido sólido(g/g)
Cubiertas de almendra	6-8	150-190	0-330	300um	4-6
Residuos maíz	8	150-190	1.5-330	1	8
E. globulus	-	181	37.5	8	6
Arundo Donax	35	150-200	1-10	8	8
Yellow poplar	0.5	190-220	2-7.5	6	13-50
Yellow poplar	70-75	220-260	<1	5	15
Fibra de maíz	0.5	210-220	2	1.6	10-20
Aspen	8	180-220	2.5-30.5	0.5-1	80
Eucalipto	1.5	0-224	56	8	8
Pinus pinaster	0-56	190-210	4-8	2-12	-

2.3.2 Pretratamiento con pH controlado

La hemicelulosa contiene ácidos urónicos y se encuentra sustituida con grupos acetilo los cuales son liberados a medida que esta se solubiliza. Los grupos acetilo reaccionan con agua para formar ácido acético el cual causa disminución del pH en el líquido. Con el fin de aumentar la generación de oligómeros y monómeros y disminuir la degradación de estos últimos, es deseable que el pH se mantenga entre 5 y 7. Para lograr dicho propósito, es necesaria otra versión del agua caliente comprimida en la que se agrega una base o un búfer y es conocida como pretratamiento con pH controlado.

2.3.3 Pretratamientos ácido-básicos

El efecto de este tipo de pretratamientos y la diferencia con los ya mencionados, radica en la mayor variación de los niveles de pH. En orden de menor a mayor pH los tratamientos ácido base se clasifican en ácido concentrado, ácido diluido, Amoniac (AFEX) y cal más conocido como lime.

El uso de ácidos o bases tiene efecto en la solubilización de alguna de las fracciones y en algunos casos degradación de las mismas. Considerando solamente el efecto del pH y como se aprecia en la Figura 2-1, los pretratamientos ácidos tienden a solubilizar la hemicelulosa y aunque también la lignina, esta sufre un proceso de condensación volviendo a su forma original. Los pretratamientos alcalinos tienden a solubilizar de forma selectiva la lignina.

La cantidad de ácido y base a adicionar e incluso el efecto cuando se trata de autohidrólisis, depende de la capacidad neutralizante de la biomasa debido a compuestos alcalinos presentes en ella (Lloyd & Wyman, 2004). Tal es el caso de residuos de la cosecha de maíz los cuales presentan un pH de 8.16 cuando son dispuestos en agua con una relación de sólidos de 10% (Zimbardi et al., 2007).

Los pretratamientos en la Figura 2-1: Explosión a vapor, agua líquida caliente, ácido diluido, pretratamientos con cal y amoniac son los más estudiados y con mayor viabilidad económica (Mosier et al., 2005) por eso son los escogidos para su revisión en esta tesis.

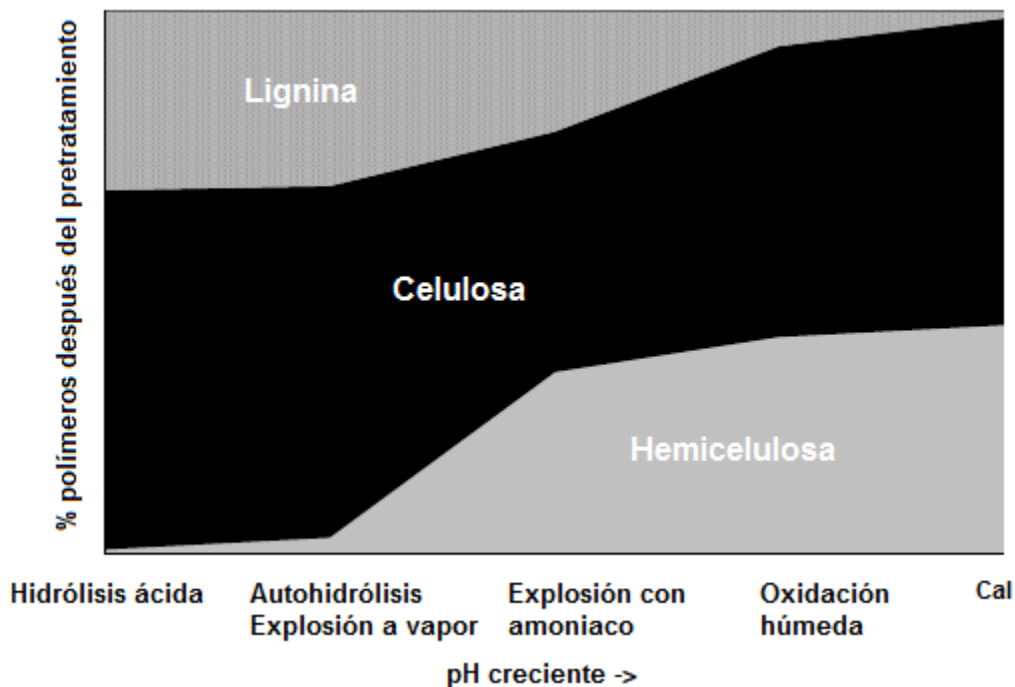


Figura 2-1: Composición relativa del sólido remanente como función del pH en cada pretratamiento (Carvalho et al., 2008).

▪ Pretratamientos con ácido

Generalmente este pretratamiento busca la máxima recuperación de azúcares a partir del material lignocelulósico ya que con la celulosa ocurren reacciones de recondensación lo que impide su solubilización.

2.3.3.1.1 Ácido concentrado

Se han probado H_2SO_4 y HCl con el fin de solubilizar los azúcares provenientes tanto de la celulosa como de la hemicelulosa. Sin embargo, tiene muchas desventajas como la corrosión de equipos y la necesidad de recuperación o neutralización del ácido, lo cual puede lograrse con la adición de bases, el uso de membranas aniónicas o en forma de H_2S a partir de tratamientos anaeróbicos de agua residual.

Este pretratamiento requiere bajas temperaturas (por ejemplo 40°C) pero largos tiempos de reacción (2 a 6h) y concentraciones de ácido que varían entre 30 y 70% (Taherzadeh & Karimi, 2007).

2.3.3.1.2 Ácido diluido

Aunque el ácido sulfúrico es el más utilizado, otros ácidos como el nítrico, hidróclórico y fosfórico han sido probados. Se usa ampliamente para la solubilización de hemicelulosa con el fin de incrementar la digestibilidad de la celulosa en procesos de hidrólisis enzimática o producir furfural a partir de pentosas solubilizadas.

La concentración de ácido es de 0.5 a 4% pero se requieren temperaturas en el rango 160 a 220°C y periodos de minutos a segundos. Las altas temperaturas conducen a la rápida degradación de azúcares que no solo bajan el rendimiento a azúcares sino que también favorece la formación de inhibidores que afectan la producción de etanol durante el proceso de fermentación (Taherzadeh & Karimi, 2007).

Los inhibidores se pueden generar por degradaciones de los monosacáridos elementales producidos durante la hidrólisis, transformaciones de compuestos como la producción de ácido acético a partir de los grupos acetilo de la hemicelulosa y fragmentaciones de la lignina (Delgenes, Moletta, & Navarro, 1996; Larsson et al., 1999; Millati, Niklasson, & Taherzadeh, 2002; Palmqvist, 2000).

Los compuestos inhibidores de fermentación obtenidos a partir de los procesos químicos sobre materiales lignocelulósicos y almidón, son clasificados en tres grupos: derivados del furano o furaldehidos, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos (Larsson et al., 1999). Sin embargo, el interés de este trabajo se centra en los dos primeros.

Los principales compuestos inhibitorios derivados del furano encontrados e identificados en los hidrolizados ácidos de materiales lignocelulósicos y amiláceos son el furfural y el HMF. El furfural es formado a partir de la degradación de las pentosas (por ejemplo la xilosa) y el HMF es originado a partir de la degradación de hexosas (por ejemplo glucosa). El furfural y el HMF son a la vez precursores de otros compuestos inhibitorios como el ácido fórmico, inclusive el HMF puede producir también ácido levulínico (Cara et al., 2008; Oliva Domínguez, 2003).

Los derivados del furano provocan disminución en la productividad de etanol y reducción en la velocidad específica de crecimiento (Larsson et al., 1999) presentándose un mayor efecto sobre la biomasa que sobre la producción de etanol. La toxicidad causada por el

furfural y el HMF se basa en la inhibición sobre algunas enzimas que actúan en el proceso de glicólisis de la levadura (Larsson et al., 1999; Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000). Por ejemplo, la inhibición directa de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), que contribuye a la excreción de acetaldehído de la célula, provoca acumulación de ésta a nivel intracelular generando un alto nivel de toxicidad. Además, los compuestos de origen furánico por su alta reactividad química pueden interactuar con algunas biomoléculas como proteínas, lípidos o ácidos nucleicos y causar daños a nivel de membranas celulares (Oliva Domínguez, 2003).

En el grupo de los ácidos orgánicos son reportados principalmente el ácido acético, fórmico y levulínico (Mussatto & Roberto, 2004). El mecanismo de inhibición de estos ácidos está dado por el ingreso en su forma protonada a través de la membrana y posterior disociación en el interior, donde el pH es mayor, lo que ocasiona la acidificación del citoplasma. El orden de toxicidad de estos compuestos depende del tamaño de la partícula (Larsson et al., 1999) ya que a menor tamaño se facilita el paso a través de la membrana, siendo el de menor tamaño el ácido fórmico, seguido del levulínico y el ácido acético.

La cantidad de inhibidores depende de la temperatura, concentración de ácido y tiempo. Mientras mayores sean estas variables se espera mayor generación de inhibidores. Sin embargo, existen alternativas como los tratamientos térmicos como el de agua caliente comprimida o autohidrólisis que sin presencia de ácido ayudan a solubilizar la biomasa quedando más dispuesta y susceptible de reaccionar en una posterior hidrólisis con la que se pueden obtener resultados similares a condiciones menos severas.

2.3.3.1.3 Base o cal

Los pretratamientos alcalinos utilizan bajas presiones y temperaturas en comparación con otras tecnologías. Este pretratamiento se puede hacer a condiciones ambientales pero los tiempos de operación son del orden de horas o días en vez de segundos o minutos como los ácidos diluidos.

Los reactivos utilizados han sido además de cal (hidróxido de calcio), hidróxido de sodio, potasio, y amoníaco. A diferencia de los pretratamientos que son catalizados con ácidos,

los compuestos alcalinos son utilizados como reactivos los cuales son convertidos en sales o incorporados como sales en la biomasa.

Las tecnologías alcalinas son muy parecidas al pulpeo kraft en el que el mayor efecto es la remoción de la lignina así como grupos acetil y ácidos urónicos de la hemicelulosa aumentando la reactividad de los polisacáridos remanentes.

Además de mejorar el acceso de las enzimas a la celulosa por encontrarse más expuesta, también mejora la efectividad de las mismas ya que con la eliminación de la lignina también se reducen los sitios de adsorción no productivos.

2.3.3.1.4 Amonia Fiber Explosion (AFEX)

Es el pretratamiento análogo a la expansión a vapor en combinación con base o cal. La biomasa se impregna con amoníaco y se somete a altas presiones (2.7MPa) pero temperaturas cerca de 65°C y tiempos cortos. Las reacciones que se presentan son las mismas que en el pretratamiento con base o cal y también hay un efecto físico adicional asociado con las fuerzas que rompen las fibras por la descompresión súbita afectando la macro y micro accesibilidad.

Dada las condiciones de temperatura y pH no se produce degradación de azúcares, sin embargo si hay cierto grado de solubilización de hemicelulosa y además cambio de fase en la cristalinidad de la estructura de la celulosa que le permite absorber más agua y por lo tanto hincharse.

2.4 Hidrólisis enzimática

Las enzimas son catalizadores biológicos de naturaleza proteica y el sustrato polimérico, cuando de materiales lignocelulósicos se trata, tiene alta complejidad estructural y química. Por tratarse de sólidos, estas reacciones se denominan heterogéneas y por tanto un factor clave es la transferencia o accesibilidad de la enzima a los enlaces de interés que le permita adsorberse o formar el complejo enzima-sustrato para después actuar a través de sus sitios activos.

Los materiales lignocelulósicos son degradados por hongos productores de lignanasas y celulasas. Como se dijo anteriormente, el pretratamiento con agua líquida caliente está enfocado a solubilizar la hemicelulosa y por tanto mejorar la porosidad, área superficial y reactividad de la celulosa cuando es hidrolizada por enzimas celulasas que contribuyen al rompimiento de enlaces glucosídicos $\beta(1-4)$. Las pentosas pueden ser convertidas a etanol por levaduras recombinantes y las xilanasas o arabinasas también han sido mezcladas con las celulasas buscando el efecto sinérgico de solubilizar la hemicelulosa remanente después del pretratamiento para mejorar el rendimiento global de todos los azúcares (Y. Kim, Mosier, & Ladisch, 2008; Y. Kim, Mosier, Hendrickson, et al., 2008), sin embargo este estudio está enfocado al rendimiento de la celulosa que es el polisacárido más recalcitrante y el de mayor cantidad después de solubilizada la hemicelulosa por efecto del mismo.

En los procesos de pretratamiento se pueden producir compuestos que inhiben la acción de las enzimas como es el caso de los fenoles derivados de la lignina y la celobiosa a partir de celulosa, además de la fusión y reubicación de la lignina encargada de generar sitios adsorbentes no productivos. En adición al pretratamiento, durante la hidrólisis también se genera la celobiosa que inhibe a la celulasa y por tanto se hace necesario adicionar celobiasa para convertirla a celulosa. En el caso de los fenoles, es usual hacer lavados con agua a 60°C para removerlos.

Dada la composición y estructura de cada material lignocelulósico es necesario experimentar y encontrar las mejores condiciones principalmente de pretratamiento que permitan la mayor producción de azúcares durante la hidrólisis, gracias al balance entre accesibilidad de la celulosa por cambios estructurales y producción de inhibidores de las enzimas.

2.5 Mecanismos de reacción de la biomasa lignocelulósica en procesos hidrotérmicos

2.5.1 Rutas de conversión hidrotérmica de la celulosa

La solubilización de los polisacáridos en los procesos hidrotérmicos (en presencia de agua líquida y a temperaturas subcríticas) presentes en la biomasa, implica el

rompimiento de enlaces y la formación de compuestos generalmente indeseables cuando de producción de bioetanol se trata. La identificación y las rutas de conversión proporcionan una idea de los compuestos que se espera obtener a partir de la conversión hidrotérmica de la biomasa lignocelulósica a la vez que proporcionan el entendimiento necesario en la posterior proposición de los modelos cinéticos que permiten predecirlos.

La celulosa es solubilizada durante los procesos hidrotérmicos en forma de oligosacáridos, monómeros e isómeros. La velocidad de solubilización se incrementa a medida que el agua se acerca a su temperatura crítica y se hace más evidente la degradación. Los productos de este proceso corresponden a glucosa, fructosa, celobiosa, celotriosa, 1-6anhidroglucosa (levoglucosano por deshidratación), celotetraosa, furfurales y varios ácidos carboxílicos. La ruta continúa por medio de reacciones de condensación retro-aldol, tautomería ceto-enólica, deshidratación y descarboxilación, entre otras (Figura 2-2).

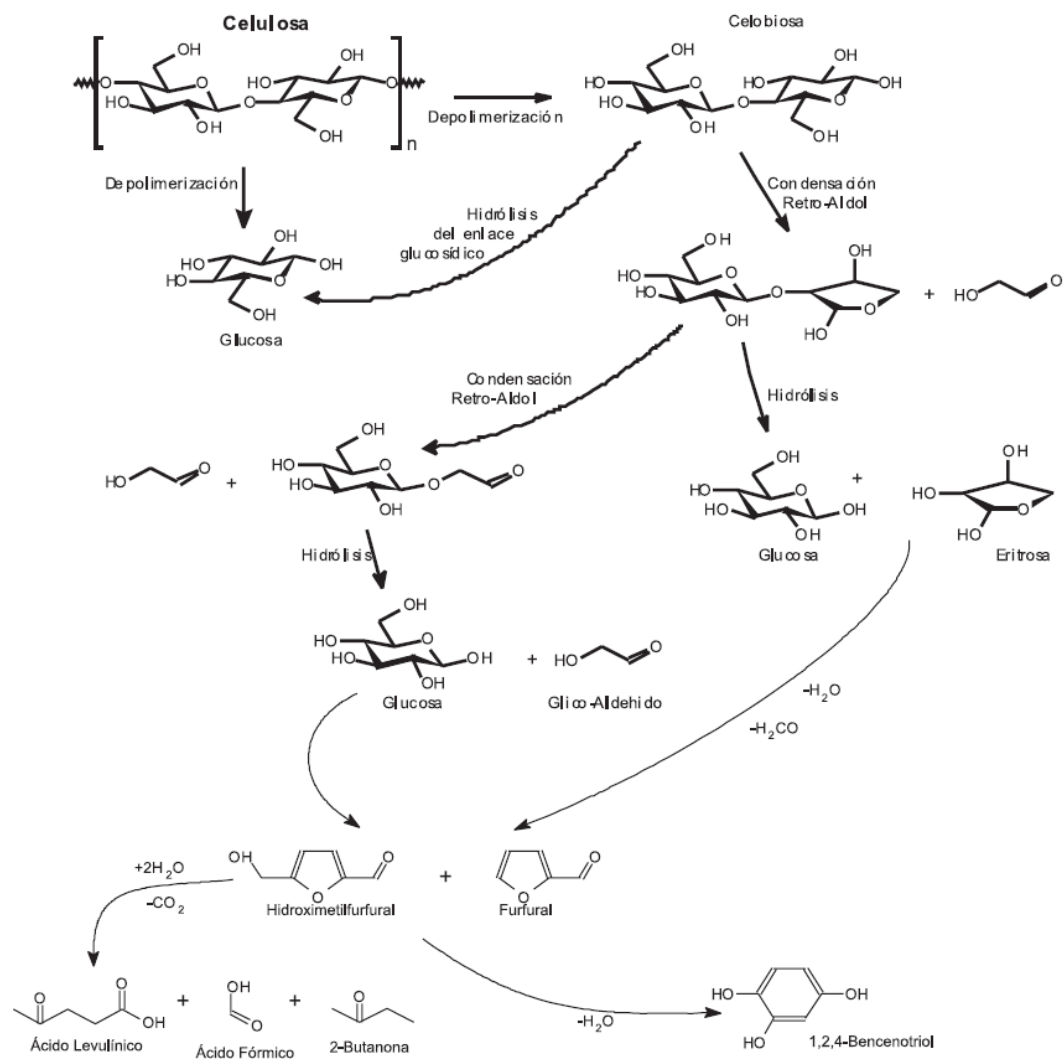


Figura 2-2: Conversión hidrotérmica de celulosa. (Castro V. et al., 2008)

2.5.2 Rutas de conversión hidrotérmica de la hemicelulosa

Al inicio se pensó que la hidrólisis de los polisacáridos se daba solamente por la contribución de protones o grupos hidroxilo, sin embargo no fue hasta la época de 1920 a 1930 que el concepto general de catálisis ácido-base fue desarrollado. Este concepto considera que incluso en catálisis ácida, las dos especies (HA , H^+) contribuyen a la aceleración de la reacción. Los ácidos fuertes se disocian y proporcionan una fuente considerable de protones cuyo efecto es el predominante mientras que los ácidos débiles se disocian y los protones forman iones hidronio con el agua y sin embargo se reconoce

su acción. En general, cualquier catalizador ácido dissociado o no en su forma protonada contribuye a la cinética de reacción (Baugh & Mccarty, 1986; Lu, 2008).

Las sales también presentes en la biomasa cambian la cinética de reacción de la xilosa así como lo midió Lu (2008) al utilizar en un caso agua desionizada y en el otro una sal neutra como NaCl con el fin de alterar la fuerza iónica.

Una vez la xilosa o arabinosa se solubiliza sufre reacciones de degradación catalizadas por protones, al igual que la glucosa. Una reacción dominante es la deshidratación de la xilosa o arabinosa como se muestra en la Figura 2-3. La xilosa es protonada primero en el oxígeno 2, O₂, resultando en la formación de dehidrofurano a través de la pérdida de una molécula de agua. Después de más pasos de deformación, la dehidrofurano pierde un par de moléculas de agua y se convierte en furfural (Figura 2-3).

También se ha reportado que en condiciones ácidas tanto la xilosa como el furfural son convertidos en sustancias húmicas (Y. Kim, Kreke, & Ladisch, 2012).

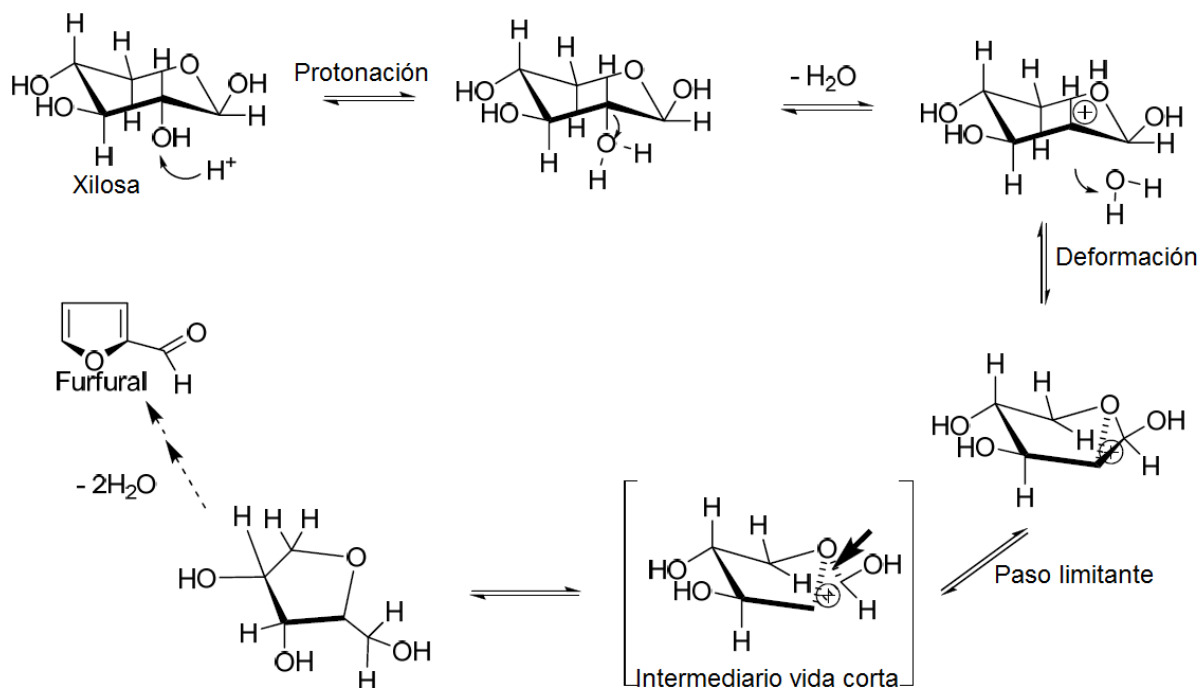


Figura 2-3: Ruta de deshidratación de xilosa catalizada por protones. Lu, 2008.

La hemicelulosa se encuentra acetilada o sustituida por grupos acetilo estos son altamente reactivos en condiciones hidrotérmicas neutras. Reaccionan por hidrólisis en el intervalo 478-523 K. La conversión es completa sin presentar acciones secundarias o de competencia como se aprecia en la Figura 2-4 (Castro V. et al., 2008).

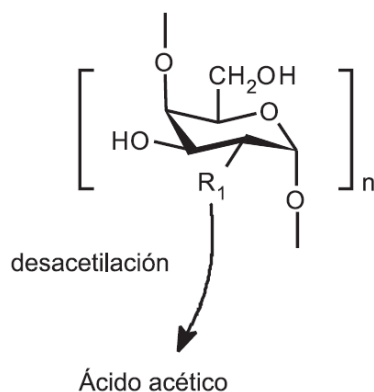


Figura 2-4: Deacetilación de hemicelulosa en procesos hidrotérmicos. (Castro V. et al., 2008).

2.5.3 Rutas de conversión hidrotérmica de la lignina

Como se mencionó anteriormente en la descripción de los constituyentes de la biomasa lignocelulósica, la lignina se compone principalmente por unidades de fenilpropano, principalmente el guayacol, catecol, fenol y ácido vanilínico. La aparición de estas sustancias sugiere que el mecanismo de descomposición hidrotérmica es compartido entre hidrólisis y pirolisis.

Un esquema generalizado de estas reacciones se muestra en la Figura 2-5 para un ambiente carente de oxígeno, ya que en el caso contrario se producen fenoles pero la ruta continúa hasta oxidarse a ácidos carboxílicos y productos carbonizados (Castro V. et al., 2008).

Estas reacciones ocurren generalmente a temperaturas más altas que la de fusión de la celulosa, es decir, alrededor de 230 °C.

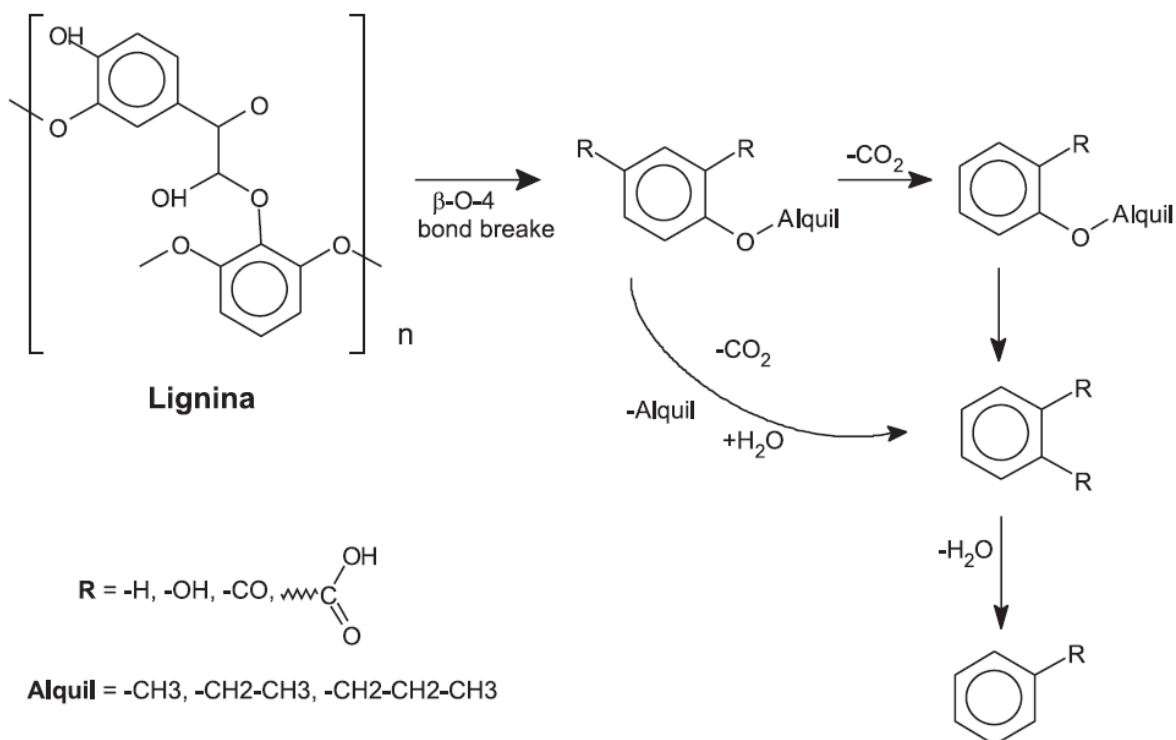


Figura 2-5: Conversión hidrotérmica de la lignina en ausencia de oxígeno. (Castro V. et al., 2008).

2.6 Modelos cinéticos de la solubilización de polisacáridos

Un modelo es una imitación de la realidad y un modelo matemático es una forma de representación. No se debe olvidar o conseguir ser distraídos por el modelo al punto que olvidemos la aplicación real que nos impulsó a modelar (Hangos & Cameron, 2001). Otra definición que nos enmarca más en un objeto de estudio es la siguiente:

un modelo de un sistema denotado como un objeto o conjunto de objetos cuyas propiedades se desean estudiar, es una herramienta para resolver preguntas acerca del sistema sin tener que hacer experimentación (Ljung & Glad, 1994).

Tradicionalmente los modelos han sido clasificados como “empíricos”, “semiempíricos” (modelos que incorporan aproximaciones empíricas a las ecuaciones fenomenológicas), o fenomenológicos, que se basan completamente en los fenómenos de transporte y leyes

de conservación de masa y energía (tomado de Rittman et al., 1982 en Corredor & Caicedo (2005)).

Para desarrollar este tipo de modelos se aconseja aplicar la siguiente metodología (Rice & Do, 1995):

1. Hacer un bosquejo del sistema a modelar considerando las suposiciones y etiquetarlo definiendo la geometría y cantidades físicas y químicas.
2. Seleccionar cuidadosamente las variables dependientes o de respuesta.
3. Seleccionar las posibles variables independientes. Se sabe que los cambios en estas deberían afectar necesariamente las variables dependientes.
4. Seleccionar los parámetros que se espera sean importantes (constantes físicas, tamaño, forma), además considerar aquellos parámetros que no son constantes (ej. la viscosidad cambiando con la temperatura).
5. Bosquejar el comportamiento esperado de la(s) variable(s) dependiente(s).
6. Establecer un volumen de control para un elemento finito o diferencial del sistema a ser modelado (por ejemplo, el reactor de hidrólisis), especificando los elementos y las corrientes de entrada y salida.
7. Escribir las leyes de conservación para el elemento diferencial de volumen: Expresar los flujos y los términos de velocidad de reacción usando símbolos generales, los cuales son tomados como cantidades positivas, los signos son introducidos solamente cuando los términos son insertados de acuerdo a las reglas de las leyes de conservación.
8. Convertir las ecuaciones a ecuaciones diferenciales. Por medio de la definición de derivada (como límite).
9. Introducir las formas específicas de los flux (por ejemplo, $J_r = -D \frac{\partial C}{\partial r}$ y las velocidades de reacción ($R_A = kC_A$)).
10. Escribir todas las posibilidades para los valores de frontera de las variables dependientes; la selección entre estas será hecha en conjunto con el método de solución seleccionado.

11. Buscar los métodos de solución, y considerar las posibles aproximaciones para: i. definir la ecuación, (ii) las condiciones de frontera y (iii) una solución final aceptable.

No olvidar que el modelamiento y la solución deben estar de acuerdo con la experimentación y la evidencia operacional para que tenga un valor real.

Un estudio cinético riguroso de la hidrólisis ácida de materiales lignocelulósicos es muy difícil debido a varios factores como: (i) protección contra ataques químicos (o biológicos) a la estructura de todas las células, (ii) acceso difícil de protones a la materia prima debido a la hidrofobicidad de la lignina, (iii) interacción con otros componentes, (iv) presencia de enlaces fuertes en el material (entre unidades de xilosa, grupos acetilo, ácidos urónicos, otros azúcares, lignina, etc.), (v) exposición variable de superficie hemicelulósica durante la reacción (Carrasco & Roy, 1992; Rodr, Ram, Garrote, & Manuel, 2004). Por tal razón es necesario aplicar simplificaciones a los estudios cinéticos tales como el uso de las principales leyes cinéticas válidas para sistemas homogéneos (reacciones pseudohomogéneas) o la suposición de que los materiales lignocelulósicos no reaccionan entre ellos. Este tipo de modelos se empezaron a implementar por Saeman (1945) y en la Tabla 2-2 se aprecia que los modelos que se implementan actualmente siguen conservando esta esencia.

Tabla 2-2: Modelos de degradación de polisacáridos de materiales lignocelulósicos y almidón reportados en la literatura.

Autor	Reactivos: Productos	Condiciones	Mecanismo y Modelo	Parámetros hallados	Mejores resultados
<p>Rodr et al., 2004</p> <p>(Gámez, González-Cabriales, Ramírez, Garrote, & Vásquez, 2006. :En este trabajo se utilizan los mismos modelos que en 2004 pero utilizando ácido fosfórico como catalizador y no se muestra en esta tabla.</p> <p>También Lavarack, Gri, & Rodman, 2002 después de evaluar varios modelos concluye que este es el que mejor predice los datos experimentales)</p>	<p>Bagazo de caña</p> <p>Glucano: glucosa, HMF</p> <p>Xilano: xilosa, furfural, ácido acético</p> <p>Arabano: arabinosa, ácido acético</p>	<p>Ácido nítrico (2-6%)</p> <p>Tiempo reacción (0-300 min)</p> <p>Temperatura (100-128°C)</p>	<p>$Polímeros \xrightarrow{K_1} Monómeros \xrightarrow{K_2}$</p> <p><i>Productos de descomposición</i></p> $M = M_0 e^{-K_2 t} + \alpha P_0 \frac{K_1 - K_2}{K_1} * \dots$ $e^{-K_1 t} - e^{-K_2 t}$ <p><i>P: Polímero g/l</i></p> <p><i>M: monómero g/l</i></p> <p><i>t: tiempo min</i></p> <p><i>α: fracción de polímero más susceptible a la degradación hidrolítica</i></p> <p><i>K_i: Arrhenius</i></p>	<p>K_1, K_2, α, (valores diferentes según condiciones de operación)</p>	<p>Glucosa: 3-5 g/l no se degradó</p> <p>Xilosa, 21g/l a 180min, 128°C y 2% de HNO₃</p> <p>Arabinosa, 2g/l no se degradó</p> <p>Ácido acético, 4g/l, al comienzo de la reacción, 128°C y 6% de HNO₃</p>

(B Girisuta, Janssen, & Heeres, 2006)	Glucosa: HMF, ácido levulínico, sustancias húmicas	Ácido sulfúrico (0.05-1 M), temperatura (140-200 °C), concentración inicial de glucosa (0.1 y 1 M)	$Glucosa(G) \xrightarrow{H^+, K_{1G}} HMF(H) + 3H_2O$ $G \xrightarrow{H^+, K_{2G}} s. \text{ húmicas}$ $H + 2H_2O \xrightarrow{H^+, K_{1H}} \text{ác. levulínico}$ <p>+ác. Fórmico</p> $HMF \xrightarrow{H^+, K_{2H}} s. \text{ húmicas}$ $R_1 = k_{1G}(C_G)^{aG}(C_{H^+})^{\alpha G}$ $R_2 = k_{2G}(C_G)^{bG}(C_{H^+})^{\beta G}$ $R_3 = k_{1H}(C_H)^{aH}(C_{H^+})^{\alpha H}$ $R_4 = k_{2H}(C_H)^{bH}(C_{H^+})^{\beta H}$ $C_{H^+} = C_{H_2SO_4} + \frac{1}{2}(-K_{a, HSO_4^-} + \sqrt{K_{a, HSO_4^-}^2 + 4C_{H_2SO_4}K_{a, HSO_4^-}})$ <p>K_{a, HSO_4^-}: constante de disociación del HSO_4^- en el rango de temperatura</p> $k_{1G} = k_{1RG} \exp \left[\left(-\frac{E_{1G}}{R} \right) \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_R} \right) \right]$ $k_{2G} = k_{2RG} \exp \left[\left(-\frac{E_{2G}}{R} \right) \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_R} \right) \right]$ $k_{1H} = k_{1RH} \exp \left[\left(-\frac{E_{1H}}{R} \right) \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_R} \right) \right]$ $k_{2H} = k_{2RH} \exp \left[\left(-\frac{E_{2H}}{R} \right) \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_R} \right) \right]$	$k_{1RG}, E_{1G}, aG, \alpha G$ $k_{2RG}, E_{2G}, bG, \beta G$ $k_{1RH}, E_{1H}, aH, \alpha H$ $k_{2RH}, E_{2H}, bH, \beta H$ <p>Fueron tomados de Girisuta et al., 2005 (trabajo no publicado)</p>	
---------------------------------------	---	--	--	---	--

(Tasić, Konstantinović, Lazić, & Veljković, 2009)	Almidón: dextrosa equivalente, HMF	Ácido clorhídrico o ácido sulfúrico (0.5-2M) Relación peso papa/volumen ácido, 1:0.75, 1:1 y 1:2.	$Polímeros \xrightarrow{K_1} Máxima\ dextrosa$ $equivalente \xrightarrow{K_2} HMF$	K_1 , según condiciones de operación y solo con ácido clorhídrico K_2 no se determinó porque HMF siempre estuvo por debajo de la concentración inhibitoria (0.2 g/l)	Máxima dextrosa equivalente (DE) 94% , 1M de ácido clorhídrico y relación peso papa/volumen ácido 1:2(w/v)y 86% con ácido sulfúrico. HMF, 0.1g/l, 60min, 98°C.
(Hosseini & Shah, 2009b)	Hemicelulosa (como sólido poroso cilíndrico): xilopentosa, xilotetrosa, xilotriosa, xilobiosa, xilosa, productos de degradación	Temperatura (160°C) pH=4.75	$\frac{dC_W}{dt} = \frac{d}{dx} \left(D \frac{dC_W}{dx} \right)$ $\frac{dC_H}{dt} = 0.2K_H C_H C_W$ $\frac{dC_5}{dt} = 0.2K_H C_H C_W - K_5 C_5 C_W - \frac{d}{dx} \left(D_{5/W} \frac{dC_5}{dx} \right)$ $\frac{dC_4}{dt} = 0.2K_H C_H C_W - K_4 C_4 C_W - \frac{d}{dx} \left(D_{4/W} \frac{dC_4}{dx} \right)$	K_d, K_2, K_3, K_4, K_5 K_H, α_4, α_5	La máxima producción de xilosa se da un tiempo aproximado de 1000 min y a una distancia del sólido poroso desde el centro del eje axial, hasta 2.5, 4.0 y 5mm del mismo. Es decir, se presentan 3 máximos en la

			$\frac{dC_3}{dt} = 0.2K_H C_H C_W + (1 - \alpha_5)K_5 C_5 C_W$ $- K_3 C_3 C_W$ $- \frac{d}{dx} \left(D_{3/W} \frac{dC_3}{dx} \right)$ $\frac{dC_2}{dt} = 0.2K_H C_H C_W + 2\alpha_5 K_5 C_5 C_W$ $- 2\alpha_4 K_4 C_4 C_W + (1$ $- \alpha_4)K_4 C_4 C_W - K_2 C_2 C_W$ $- \frac{d}{dx} \left(D_{2/W} \frac{dC_2}{dx} \right)$ $\frac{dC_X}{dt} = 0.2K_H C_H C_W + \alpha_5 K_5 C_5 C_W + 2(1$ $- \alpha_5)K_5 C_5 C_W - 2(1$ $- \alpha_4)K_4 C_4 C_W + 3K_3 C_3 C_W$ $- 2K_2 C_2 C_W$ $- \frac{d}{dx} \left(D_{X/W} \frac{dC_X}{dx} \right)$ $\frac{dC_d}{dt} = K_d C_X C_W \frac{d}{dx} \left(D_{d/W} \frac{dC_d}{dx} \right)$ <p> C: Concentración normalizada K: Constantes cinéticas D: Difusividad efectiva </p>		concentración de xilosa.
--	--	--	--	--	--------------------------

			<p>x: eje axial del sólido poroso cilíndrico</p> <p>Subíndices $W, H, 5, 4, 3, 2, X, d$ hacen referencia al agua, hemicelulosa, xilopentosa, xilotetrosa, xilotriosa, xilobiosa y productos de degradación, respectivamente</p> <p>α_5: Probabilidad de romper los enlaces del monómero central con los monómeros vecinos en la xilopentosa</p> <p>α_4: Probabilidad de romper el enlace entre los dos monómeros centrales de la xilotetrosa.</p>		
(Qi & Pel, 2007)	D-xilosa: furfural, productos de descomposición	<p>No se utiliza catalizador.</p> <p>Temperatura (180-220 °C)</p> <p>Presión 10 MPa</p>	<p>$xilosa \xrightarrow{k_1} furfural \dots$</p> <p>$\xrightarrow{k_3} \text{Productos de descomposición}$</p> <p>$xilosa \dots$</p> <p>$\xrightarrow{k_2} \text{Productos de descomposición}$</p> <p>$c_f = k_1 c_0 [\exp(-kt) - \exp(-k_3 t)] / (k_3 - k)$</p> <p>$c_f$: concentración molar de furfural</p> <p>$k = k_1 + k_2$</p>	<p>$k, k_1, k_2, k_3,$</p> <p>Energías de activación aparentes según Arrhenius.</p>	

(Jing & Lü, 2008)	Glucosa:HM F, ácido levulínico, productos de descomposi ción, material húmico	No se utiliza catalizador. Temperatura (180-220 °C) Presión 10 MPa	$Glucosa \xrightarrow{k_1} HMF \dots$ $\xrightarrow{k_3} AL \xrightarrow{k_5} \text{productos de descomp.}$ <p>AL: ácido levulínico</p> $Glucosa \xrightarrow{k_2} m. \text{ húmico}$ $HMF \xrightarrow{k_4} m. \text{ húmico}$ $C_{glu} = C_{glu,0} e^{-k_G t}$ $C_{HMF} = \frac{k_1 C_{glu,0}}{k_H - k_G} (e^{-k_G t} - e^{-k_H t})$ $C_{AL} = \frac{k_1 k_3 C_{glu,0}}{(k_H - k_G)(k_5 - k_G)(k_5 - k_H)} [(k_5 - k_H)e^{-k_G t} - (k_5 - k_G)e^{-k_H t} + (k_H - k_G)e^{-k_5 t}]$ $k_G = k_1 + k_2$ $k_H = k_3 + k_4$	k_1, k_2, k_3, k_4, k_5 a diferentes temperaturas. Energías de activación aparentes según Arrhenius.	
-------------------	---	---	---	---	--

En la literatura revisada, la cantidad de productos formados como azúcares y productos de degradación, incluidos los inhibidores a partir de polímeros se han modelado en la mayoría de los casos usando constantes cinéticas aparentes las cuales han aportado un entendimiento global del proceso de reacción hidrolítica a partir de modelos empíricos. Dichos modelos toman como variables independientes la velocidad de calentamiento, concentración de ácido, temperatura de reacción, tiempo de reacción, etc. También se incluye la fracción de polímeros más susceptible a la degradación hidrolítica que está relacionada con la especie de biomasa. Los factores como este último y las constantes cinéticas aparentes que tienen implícita la información del carácter heterogéneo de la reacción hacen necesario el modelamiento cinético de los pretratamientos hidrotérmicos sobre el material lignocelulósico de la planta de banano.

3. Materiales y Métodos

3.1 Raquis de banano

El eje de los racimos de banano *Cavendish*, conocido como raquis, fue colectado en la región del Urabá antioqueño situado entre 07° 40' 37'' y 08° 05' 00'' latitud norte y entre 76° 38' 05'' y 76° 44' 00'' longitud oeste. Después fue enviado al laboratorio de Bioprocesos y Flujos Reactivos, donde se secó en estufa a 50°C por 5 días. Después de secado, el agua remanente fue medida utilizando un analizador de humedad halógeno HB43 (Mettler Toledo Inc., Columbus, OH) a 105°C la cual correspondió al 5.54 ±0.18%. Tamaños de partícula menores a 0.42 mm y entre 2.83 y 6.35 mm fueron obtenidos al moler y tamizar este material seco.

3.2 Composición química

El raquis sin ser pretratado se sometió a extracción con agua y etanol consecutivamente con el fin de remover compuestos no estructurales, según los procedimientos analíticos del Laboratorio Nacional de Energía Renovable de los Estados Unidos (NREL por sus siglas en inglés) NREL/TP-510-42619. El sólido resultante se secó a 45°C hasta que la humedad fue menor a 5% y luego fue sometido a una hidrólisis ácida cuantitativa, según NREL/TP-510-42618 con el fin de solubilizar los polisacáridos. El hidrolizado se filtró a través de crisoles porosos con tamaño de poro de 15 μ m y la fracción líquida fue analizada con HPLC usando un Módulo de Separación Waters 2695 con un detector de índice de refracción Waters 2414 y una columna Bio-Rad Aminex® HPX-87H, a una temperatura de 65°C y un flujo de H₂SO₄ 5mM fijado en 0.6ml/min. El precipitado se secó para cuantificar lignina ácido insoluble y corrección por cenizas de acuerdo al NREL/TP-510-42617. La lignina ácido soluble se midió sobre la solución filtrada a una longitud de onda de 320nm, usando un espectrofotómetro Genesys 6 fabricado por ThermoSpectronic. La

longitud de onda para medición de lignina ácido soluble fue adoptada al comparar estudios realizados sobre desechos de producción agrícola de maíz.

En cuanto a los sólidos pretratados con agua líquida caliente, estos fueron lavados dos veces con agua a 60°C con el fin de eliminar todo el material soluble impregnado en la biomasa (Li et al., 2010) y secados a 45°C hasta alcanzar una humedad menor al 1%. El mismo procedimiento para la caracterización de la composición de biomasa fue aplicado a los sólidos provenientes del pretratamiento, midiendo únicamente el contenido de carbohidratos, para el seguimiento de la ruta de conversión de azúcares. Y en la fase líquida se caracterizó carbohidratos y compuestos de degradación en HPLC.

La determinación de los oligosacáridos se llevó a cabo siguiendo el procedimiento analítico NREL/TP-510-42623. Este proceso se escaló a volúmenes menores que el recomendado, con el uso de ampollas de 1.5 ml las cuales se sellaron con una lámina redonda de latón cuyo espesor era 0.08 mm. Dicha lámina se fijó entre la tapa y un tapón de teflón con el fin de soportar la alta presión cuando eran llevadas al autoclave.

Debido a que la glucosa, xilosa y arabinosa se encuentran en forma anhidra en la materia prima, el cálculo de la conversión a azúcares debe considerar el cambio en el peso molecular y los subproductos como resultado de las reacciones hidrolíticas. Este asunto se resolvió usando la Ecuación (3-1) propuesta por Y. Kim et al., 2012 para el caso de la xilosa, donde $[X]$ corresponde a la concentración de la xilosa en (g/l) y el subíndice t al tiempo en min.

$$\varphi = \frac{[X]_{t=t}}{[X_n]_{t=0} * \frac{150}{132} + [X]_{t=0}} \quad (3-1)$$

Así mismo, para el caso de la glucosa se cambia la relación de pesos moleculares por 180/162 (Zeng et al., 2007a).

3.3 Pretratamiento con agua líquida caliente

El pretratamiento se desarrolló en reactores batch de acero inoxidable con un volumen de 4 ml (Figura 3-2). Este tamaño es suficientemente pequeño para alcanzar la máxima

temperatura propuesta en el centro, en menos de 30 segundos. El tubo se llenó hasta tres cuartos de su capacidad (3 ml). La carga de sólido fue equivalente a 5% y la condición óptima de tiempo y temperatura se evaluó con una carga de sólido del 15%p/p. Además dos tamaños de partícula fueron evaluados (< 0.42 mm) según lo reportado por (Zeng et al., 2007) y entre (2.83 y 6.35 mm) con el fin de comparar el efecto del tamaño de partícula para este tipo de material fibroso. La menor carga se propone con el fin de evitar efectos de transferencia de masa (Dien et al., 2008) y elucidar las reacciones como lo presenta el trabajo de modelamiento cinético realizado por B Girisuta, Danon, Manurung, Janssen, & Heeres (2008) quienes utilizaron esta misma carga. La temperatura y tiempos de pretratamiento fueron combinados así: 180°C con 10, 20, 30 y 60 min; 200°C con 5, 10, 15, 30 y 60 min; y 220°C con 1, 5, 10, 20, 30 y 60min, estos niveles se escogieron a partir de un diseño de experimentos reportado en la sección 4.2. Un baño de arena fluidizado Tecam® (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL) fue usado para calentar y mantener los tubos a las temperaturas mencionadas. Una vez el tiempo planeado se cumplió, los tubos se pasaron a un baño con hielo con el fin de parar las reacciones.



Figura 3-1: Tamaño de partícula diseño experimental.

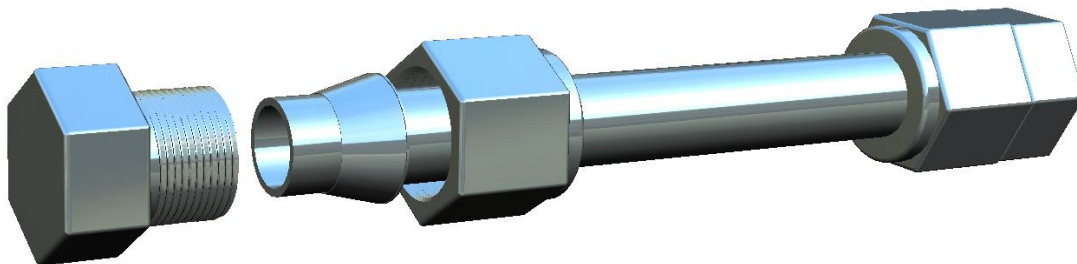


Figura 3-2: Reactor batch para pretratamiento con agua caliente.

3.4 Hidrólisis enzimática

Las condiciones de hidrólisis enzimática fueron las mismas para todas las corridas con el fin de evidenciar el efecto del pretratamiento sobre el rendimiento total de azúcares. Sin lavar los sólidos, 3ml de buffer citrato con pH 4.8 se agregó alcanzando un volumen total de 6ml. 15FPU/g-glucano y 40CBU/g-glucano de Celulasa comercial (Spezyme CP) y β -glucosidasa (Novozyme 188) fueron agregadas, respectivamente con base en el glucano sometido a pretratamiento. La reacción se realizó a 50°C y 250rpm en un agitador orbital, durante 72 horas.

La ficha técnica de la celulasa se puede observar en el anexo B y la medición de la actividad como anexo C.

3.5 Análisis HPLC

Se prepararon curvas de calibración con estándares de glucosa, xilosa, arabinosa, ácido acético, furfural y 5-hidroximetilfurfural (HMF) tal como se aprecia en el Anexo A. Todos estos compuestos fueron cuantificados después del análisis de composición química, el pretratamiento con ALC y la hidrólisis enzimática

A continuación se presenta el diagrama de proceso, el cual resume los procedimientos que se acaban de mencionar.

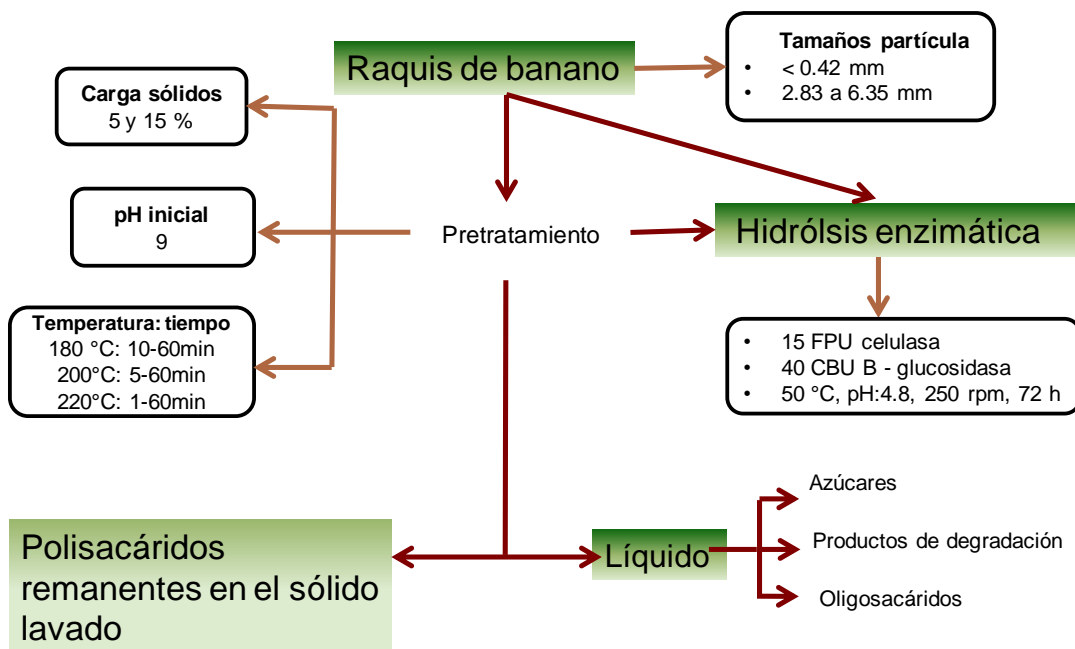


Figura 3-3: Diagrama de proceso.

3.6 Modelado y simulación del pretratamiento con agua líquida caliente

Debido a que no se evidenció formación de furfural, se observa degradación de los oligómeros y siguiendo con los modelos empíricos usados para modelar las reacciones de hidrotratamiento reportados en la Tabla 2-2 sobre biomasa lignocelulósica, en este trabajo se propone el siguiente mecanismo de reacción:

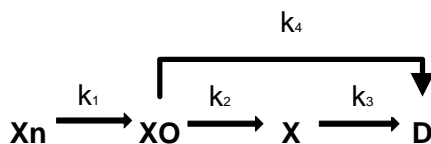


Figura 3-4: Ruta de solubilización de polisacáridos 1.

Donde Xn corresponde al polisacárido, XO a los oligómeros, X al monómero y D a los productos de degradación o sustancias húmicas. Cuando no hubo adición de ácido, Kumar & Wyman (2008) encontraron que la selectividad a xilosa es baja cerca de pHs neutros por tanto en su estudio, la degradación directa de oligómeros a sustancias

húmicas ocurre en paralelo con la formación de monómeros tal como se plantea en el modelo propuesto en este estudio.

Como se está operando a temperaturas mayores de 180 °C, no se tuvo en cuenta las fracciones fácil y difícilmente hidrolizables (Lu, 2008). Otras suposiciones del modelo son que no hay interacción entre los componentes de la biomasa y que se está operando a tamaños de partícula menores a 6.35mm correspondiente a la experimentación en este trabajo, no hay efectos de transferencia de masa y el efecto dominante es la reacción.

A partir de dicho mecanismo, se proponen las siguientes ecuaciones cinéticas:

$$\frac{d[X_n]}{dt} = -k_1[X_n] \quad (3-2)$$

$$\frac{d[XO]}{dt} = k_1[X_n] - k_2[XO] - k_4[XO] \quad (3-3)$$

$$\frac{d[X]}{dt} = k_2[XO] - k_3[X] \quad (3-4)$$

Integrando la Ecuación (3-2) Desde $t = 0$ con $[X_n]_{t=0}$ hasta t con $[X_n]_t$ se obtiene:

$$[X_n]_t = [X_n]_{t=0} e^{-k_1 t} \quad (3-5)$$

En términos de rendimiento, la Ecuación (3-5) se expresa como:

$$\frac{[X_n]_t}{[X_n]_{t=0}} = e^{-k_1 t} \quad (3-6)$$

Reemplazando la Ecuación (3-5) en la Ecuación (3-3)

$$\frac{d[XO]}{dt} = k_1[X_n]_{t=0} e^{-k_1 t} - k_2[XO] - k_4[XO] \quad (3-7)$$

$$\frac{d[XO]}{dt} + (k_2 + k_4)[XO] = k_1[X_n]_{t=0} e^{-k_1 t} \quad (3-8)$$

Multiplicando la ecuación anterior por $e^{(k_2+k_4)t}$ y expresando el resultado al lado izquierdo como la derivada de un producto,

$$d\{[XO]_t * e^{(k_2+k_4)t}\} = k_1[X_n]_{t=0} e^{(-k_1+k_2+k_4)t} dt \quad (3-9)$$

Integrando desde $t = 0$, con $[XO]_{t=0} = 0$ hasta t con $[XO]_t$.

$$[XO]_t = \frac{k_1[X_n]_{t=0}}{-k_1 + k_2 + k_4} \{e^{-k_1 t} - e^{-(k_2+k_4)t}\} \quad (3-10)$$

La expresión de la ecuación anterior en términos del rendimiento de oligómeros se representa como:

$$\frac{[XO]_t}{[X_n]_{t=0}} = \frac{k_1}{-k_1 + k_2 + k_4} \{e^{-k_1 t} - e^{-(k_2+k_4)t}\} \quad (3-11)$$

Reemplazando la Ecuación (3-5) y la Ecuación (3-10) en la Ecuación (3-4), se obtiene:

$$\frac{dX}{dt} + k_3 X = \frac{k_2 k_1 [X_n]_{t=0}}{-k_1 + k_2 + k_4} \{e^{-k_1 t} - e^{-(k_2+k_4)t}\} \quad (3-12)$$

Multiplicando por $e^{k_3 t}$ y expresando el resultado al lado izquierdo como la derivada de un producto,

$$d([X] * e^{k_3 t}) = \frac{k_2 k_1 [X_n]_{t=0}}{-k_1 + k_2 + k_4} \{e^{(-k_1+k_3)t} - e^{(-k_2-k_4+k_3)t}\} dt \quad (3-13)$$

Integrando desde $t = 0$, con $[X]_{t=0} = 0$ hasta t con $[X]_t$

$$[X]_t = \frac{k_2 k_1 [X_n]_{t=0}}{-k_1 + k_2 + k_4} \left\{ \frac{(e^{k_1 t} - e^{-k_3 t})}{-k_1 + k_3} + \frac{(e^{-k_2 t} - e^{-k_3 t})}{k_2 - k_3 + k_4} \right\} \quad (3-14)$$

En términos del rendimiento, esta ecuación se expresa como:

$$\frac{[X]_t}{[X_n]_{t=0}} = \frac{k_2 k_1}{-k_1 + k_2 + k_4} \left\{ \frac{(e^{-k_1 t} - e^{-k_3 t})}{-k_1 + k_3} + \frac{(e^{-k_2 t} - e^{-k_3 t})}{k_2 - k_3 + k_4} \right\} \quad (3-15)$$

La expansión de las constantes cinéticas, se realiza según la ecuación de Arrhenius de la siguiente forma:

$$k_i = k_{0i} [H^+]^{n_i} e^{\left(\frac{E_{ai}}{RT}\right)}; \quad i = 1, 2, 3, 4 \quad (3-16)$$

Donde k_{0i} corresponde al factor preexponencial, $E_{ai} [kJ/mol]$ a las energías de activación y n_i al orden de la reacción respecto a la concentración de protones.

Una etapa adicional de solubilización del monómero directamente desde el polímero también se propone de acuerdo al estudio de Mittal et al. (2009), como se muestra a continuación:

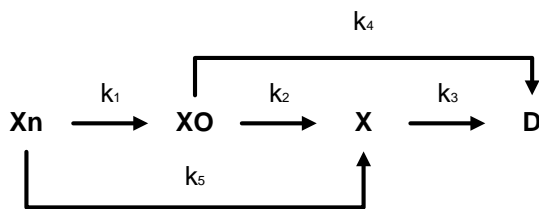


Figura 3-5: Ruta de solubilización de polisacáridos 2

Utilizando el procedimiento anterior se llega a las siguientes ecuaciones:

$$\frac{[X_n]_t}{[X_n]_{t=0}} = e^{-(k_1+k_5)t} \quad (3-17)$$

$$\frac{[XO]_t}{[X_n]_{t=0}} = \frac{k_1}{-k_1 + k_2 + k_4 - k_5} \{e^{-(k_1+k_5)t} - e^{-(k_2+k_4)t}\} \quad (3-18)$$

$$\begin{aligned} \frac{[X]_t}{[X_n]_{t=0}} = & \frac{k_5}{-k_1 + k_3 - k_5} \{e^{-(k_1+k_5)t} - e^{-k_3t}\} \\ & + \frac{k_2k_1}{-k_1 + k_2 + k_4 - k_5} \left\{ \frac{(e^{-(k_1+k_5)t} - e^{-k_3t})}{-k_1 + k_3 - k_5} + \frac{(e^{-(k_2+k_4)t} - e^{-k_3t})}{k_2 - k_3 + k_4} \right\} \end{aligned} \quad (3-19)$$

Las constantes cinéticas se expanden igual que en la Ecuación (3-16) pero el subíndice i también toma el valor de 5 que hace referencia a la ruta agregada.

Estos modelos que se acaban de proponer, se ajustaron a los datos experimentales por la minimización de la suma de los cuadrados de la desviación entre el dato predicho y experimental, utilizando la función fmincon de Matlab.

4. Resultados

4.1 Composición química

La caracterización obtenida del raquis de banano (Tabla 4-2) es diferente a la reportada por Velásquez-Arredondo et al. (2010) quienes usaron procedimientos bromatológicos. Ellos reportaron 32.1, 8.8, 1.13 y 19% de celulosa, hemicelulosa, almidón y lignina respectivamente. Sin embargo, concuerda con la reportada por Quintana et al. (2009) quienes obtuvieron en promedio y sobre base seca 51.05, 17.1 14.28 y 12.36% de celulosa, hemicelulosa lignina Klason y cenizas, respectivamente. Estos últimos autores no reportan el método de caracterización y tampoco la desviación de acuerdo a repeticiones en caso de haberlas realizado.

En cuanto a los extractivos, con agua se removi6 0.17% de la biomasa representada en glucosa, nada de xilosa y 0.01% de arabinosa, mientras que con alcohol se solubiliz6 el 3.66%. Es f6cil tender a pensar que como el fruto es rico en almid6n, el raquis que es por donde se transportan los nutrientes, tambi6n lo es. Seg6n el protocolo propuesto por Y. Kim, Mosier, Hendrickson, et al. (2008) usando amilasa y amiloglucosidasa despu6s de un proceso de gelificaci6n a 121°C, se encontr6 que el almid6n en el raquis en seis muestras es de $0.39\% \pm 0.06$. Este resultado es l6gico desde el punto de vista de la baja cantidad de glucosa removida como extractivo y tambi6n funcional porque las c6lulas del raquis son especializadas en soporte y no en almacenamiento.

Tabla 4-1: Composición raquis de banano sin extractivos.

Componente	% peso base seca (Quintana et al., 2009)	% peso base seca (este trabajo)
Celulosa (Glucano)	51.05	47.32 ± 0.007
Hemicelulosa (Xilano, galactano, arabano, acetilo)	17.1	16.93± 0.001
Lignina total	14.28	16.92± 0.004
Cenizas	12.36	15.97 ± 0.001
Total	94.79	97.14

La composición obtenida hace promisorio esta materia prima por el alto contenido de glucano y la baja concentración de grupos acetilo y lignina en comparación con otras maderas y residuos agroindustriales comunes reportados por (P. Kumar, Barrett, Delwiche, & Stroeve, 2009) (Tabla 4-3). El 2.86% no especificado para cerrar el balance se sugiere que corresponde a proteína (Tabla 4-2).

Tabla 4-2: Composición del raquis de banano.

Componente	% peso base seca
Glucano	47.32±0.007
Xilano/Galactano	13.12±0.002
Arabano	3.55±0.001
Acetilo	0.26±0.005
Lignina Ácido-Soluble	1.10±0.0002
Residuo Ácido-insoluble	15.82±0.004
Cenizas	15.97±0.001
Total	97.14

Tabla 4-3: Maderas y residuos agroindustriales comunes. Tomada de (P. Kumar et al., 2009).

Materiales lignocelulósicos	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Maderas duras	40-55	24-40	18-25
Maderas blandas	45-50	25-35	25-35
Cascarones de nuez	25-30	25-30	30-40
Cultivos de maíz	45	35	15
Pastos	25-40	35-50	10-30
Desechos de trigo	30	50	15
hojas	15-20	80-85	0
Raquis de banano (este trabajo)	47.32	16.93	16.92

4.2 Diseño de experimentos

A partir de las condiciones de operación de los pretratamientos con ALC, reportados en Tabla 2-1 se escogen los tiempos 10, 30 y 60 min, temperaturas de 180, 200 y 220°C y dos rangos de tamaños de partícula <0.42mm y entre (2.83 y 6.35mm), con el fin de analizar el efecto de cada variable sobre el rendimiento de oligómeros durante el pretratamiento y de azúcares monoméricos después de ambos, el pretratamiento y la hidrólisis enzimática. Se corrió un diseño multifactorial, multinivel en el software Statgraphics Centurion.

Tabla 4-4: Análisis de varianza para rendimiento de glucosa después del pretratamiento ALC y la hidrólisis enzimática.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:temperatura	771.422	2	385.711	42.23	0.0000
B:tiempo	85.8556	2	42.9278	4.70	0.0200
C:tamaño de part	17.7662	1	17.7662	1.95	0.1770
INTERACCIONES					
AB	257.021	4	64.2552	7.04	0.0008
AC	2.46922	2	1.23461	0.14	0.8743
BC	18.0353	2	9.01763	0.99	0.3885
RESIDUOS	200.917	22	9.13259		
TOTAL (CORREGIDO)	1353.49	35			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

Según la Tabla 4-4 sólo la temperatura y el tiempo en el pretratamiento con ALC, tienen un efecto significativo sobre la producción de glucosa después de la hidrólisis enzimática, ya que el estadístico de prueba o valor p para estos factores es menor de 0.05. El cambio en el tamaño de partícula, en los rangos propuestos, no afecta la hidrólisis de glucosa. Esto se debe a que el material bajo estudio es fibroso y de diámetro pequeño lo que hace que no haya diferencia cuando la reacción es más rápida en dirección radial.

Sabiendo ya que la temperatura tiene un efecto significativo, es importante definir cuales niveles permiten un mejor rendimiento, lo que resulta de analizar la Figura 4-1a y de la cual se concluye que es mejor operar el proceso a 200 y 220°C, y tiempos con valores cercanos a 30 min (Figura 4-1b). Tener en cuenta que los rendimientos en estas gráficas

son normalizados según la técnica de comparación introducida por Fisher conocida como método de la diferencia mínima significativa o método LSD (Least Significant Difference).

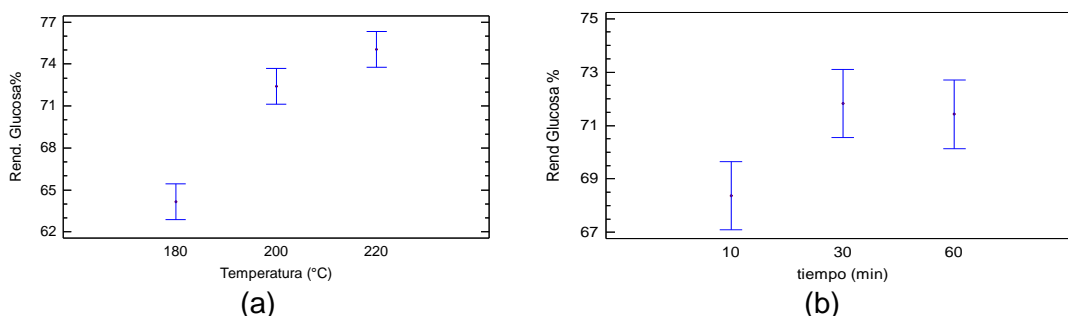


Figura 4-1: Prueba de rangos múltiples (LSD) rendimiento glucosa hidrólisis enzimática.

En el caso de la xilosa, en el análisis ANOVA se encontró que todos los factores probados son significativos. Esto era de esperarse porque es directamente el pretratamiento el que solubiliza el xilano y arabano y no las enzimas utilizadas. Aunque se ha reportado que las reacciones hidrotérmicas están limitadas por el eje axial ya que es en esa dirección que se encuentran los canales a través de los cuales se transportan los nutrientes a la planta y a la vez los cationes o aniones encargados de catalizar las hidrólisis (Hosseini & Shah, 2009a), parece que en este caso, los efectos de empaquetamiento y de capacidad de humectabilidad hacen que el rendimiento disminuya a mayor tamaño de partícula Figura 4-2a. Efectos similares ocurren en el trabajo de Cara et al. (2008). También se observa que a mayores tiempos y temperaturas hay menor rendimiento de xilosa (Figura 4-2b-c).

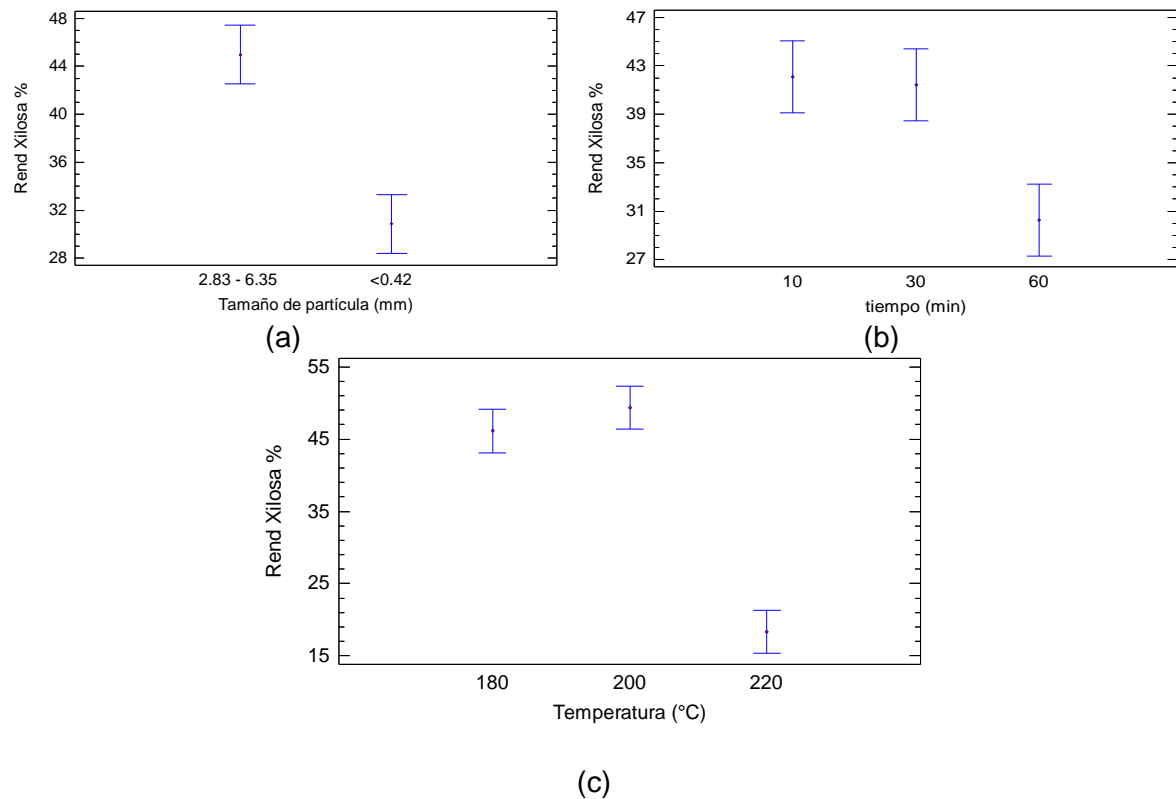


Figura 4-2: Prueba de rangos múltiples (LSD) rendimiento xilosa hidrólisis enzimática.

El análisis para arabinosa es igual al de xilosa, sin embargo, el tiempo no tiene un efecto significativo en el rendimiento de arabinosa ya que esta es más estable Figura 4-3.

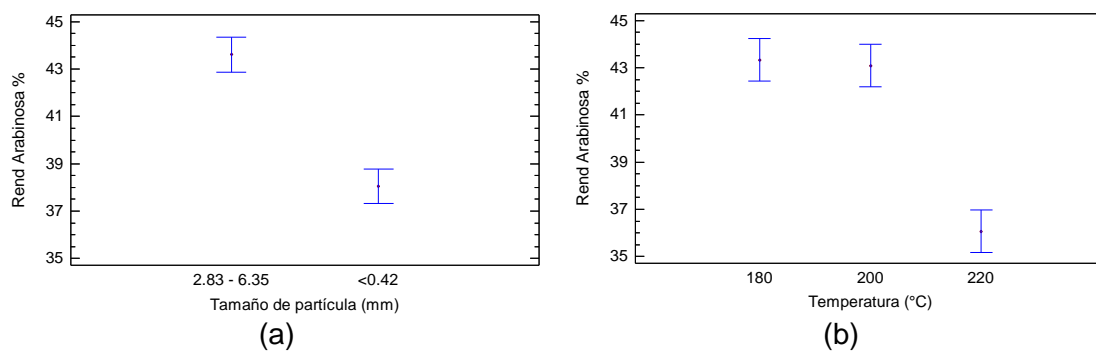


Figura 4-3: Prueba de rangos múltiples (LSD) rendimiento arabinosa hidrólisis enzimática.

Un análisis ANOVA sobre rendimiento de oligómeros sugiere que la temperatura y tiempo tienen un efecto significativo. En cuanto a los límites de temperatura seleccionados para los oligómeros, estos son idóneos puesto que recogen el comportamiento de aparición, aumento de concentración del oligómero y degradación de este a otros compuestos, se identifica un punto cercano en que se logra la máxima producción. Además, un estudio cinético en este rango estaría completo porque mostraría todas las etapas mencionadas, las cuales son significativamente diferentes Figura 4-4a y c. En el caso de los arabinooligosacáridos a 180 °C, mayor tiempo de pretratamiento incrementa su rendimiento. Se logra un rendimiento superior para un tiempo de 60min, comparado con el pretratamiento a las otras temperaturas.

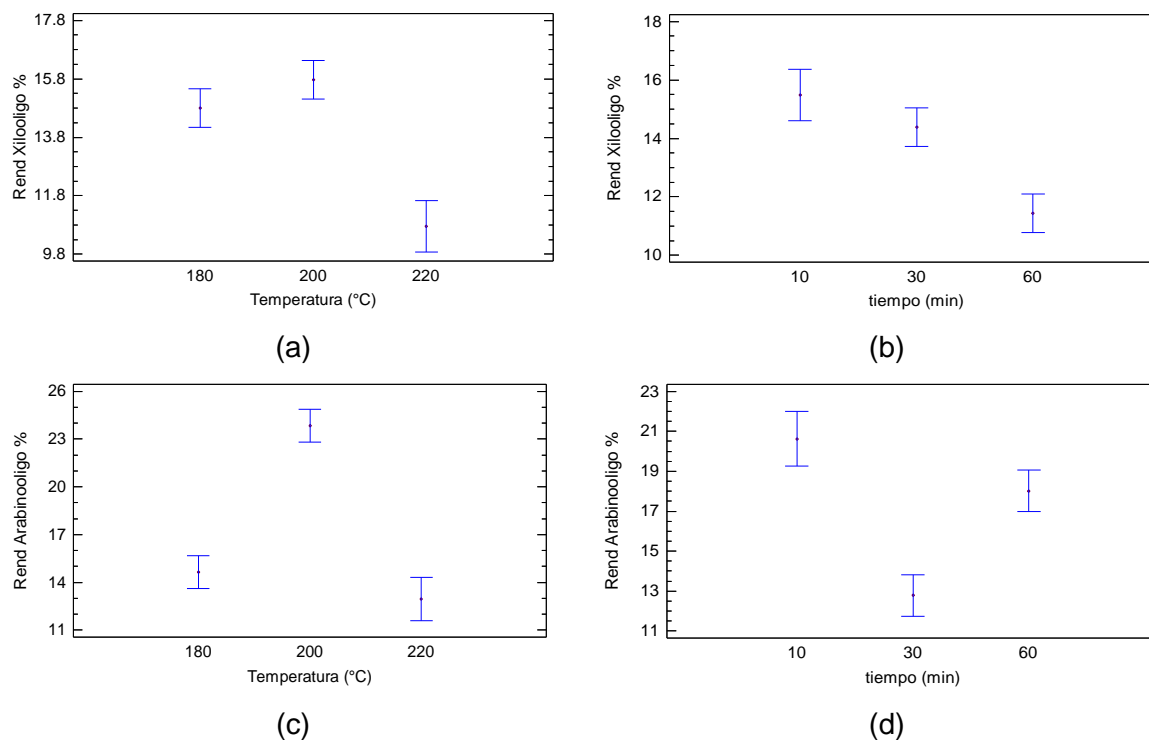


Figura 4-4: Prueba de rangos múltiples (LSD) rendimientoxilo- y arabino-oligo. Después del pretratamiento ALC.

4.3 Optimización

Las optimizaciones o combinación de variables consideradas en el diseño de experimentos que mejor rendimiento de oligómeros arroja después del pretratamiento y también, con las que mejor rendimiento de azúcares monoméricos se alcanza después

de la hidrólisis enzimática, fueron halladas utilizando el software Statgraphics Centurion. Una superficie de respuesta fue ajustada a los datos experimentales en todos los casos considerando como función una que tomara en cuenta cada variable en particular y las interacciones con ellas mismas y las demás. Solo el efecto principal de la temperatura y tiempo y sus interacciones fueron tenidas en cuenta a un tamaño de partícula entre 2.83 y 6.35mm. Con este rango se requiere menor energía en la molienda y además se obtuvo los mismos resultados de producción de glucosa después de la hidrólisis enzimática en comparación con un tamaño menor (Tabla 4-4). También, al modelo se le determinó el porcentaje de la experimentación que este podría explicar y/o predecir.

Ecuación

$$\varphi_{glucosa} = -255.7984 + 2.7476 * T + 1.6248 * t - 0.0057 * T^2 - 0.0056 * T * t - 0.0062 * t^2$$

Valor óptimo: 78.67% cuando $t = 31.82min$ y $T = 220^{\circ}C$.

Estos fueron calculados con el error total del modelo.

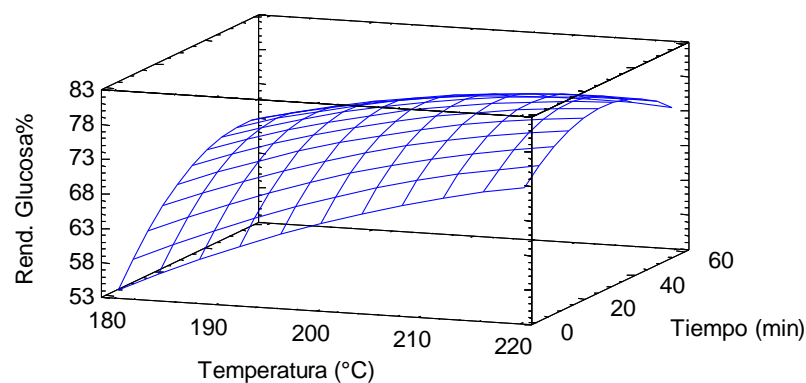


Figura 4-5: Superficie respuesta Rendimiento glucosa vs. Temperatura y tiempo.

Coeficiente de correlación

$$R^2 = 79.47\%$$

Rendimiento Arabinosa

Ecuación

$$\varphi_{Arabinosa} = -364.1427 - 4.3379 * T + 0.2873 * t - 0.0114 * T^2 - 0.002 * T * t + 0.0014 * t^2$$

Valor óptimo: 48.87% cuando $t = 60min$ y $T = 185.35^\circ C$

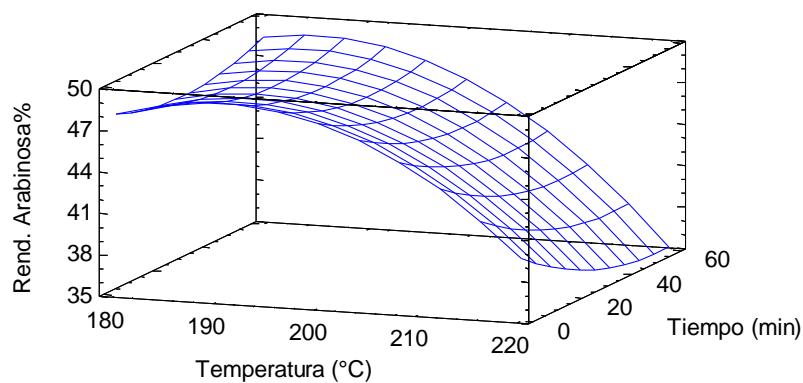


Figura 4-6: Superficie respuesta Rendimiento arabinosa vs. Temperatura y tiempo.

Coeficiente de correlación

$$R^2 = 84.51\%$$

Rendimiento Xilosa

Ecuación

$$\varphi_{Xilosa} = -2204.406 + 22.2453 * T + 7.5419 * t - 0.0545 * T^2 - 0.0355 * T * t - 0.0063 * t^2$$

Valor óptimo: 64.94% cuando $t = 11.6min$ y $T = 200.24^\circ C$

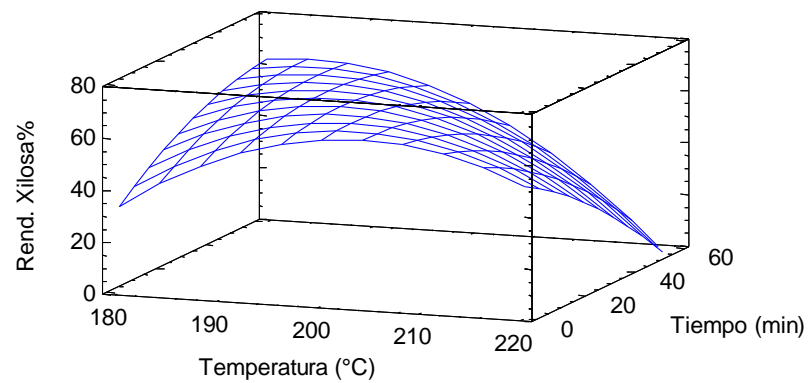


Figura 4-7: Superficie respuesta Rendimiento xilosa vs. Temperatura y tiempo.

Coeficiente de correlación

$$R^2 = 89.40\%$$

Rendimiento Xilooligómeros

Ecuación

$$\varphi_{Xilooli} = -891.6836 + 9.1261 * T + 1.5405 * t - 0.0231 * T^2 - 0.0044 * T * t - 0.0083 * t^2$$

Valor óptimo: 22.95% cuando $t = 41.28min$ y $T = 193.47^{\circ}C$

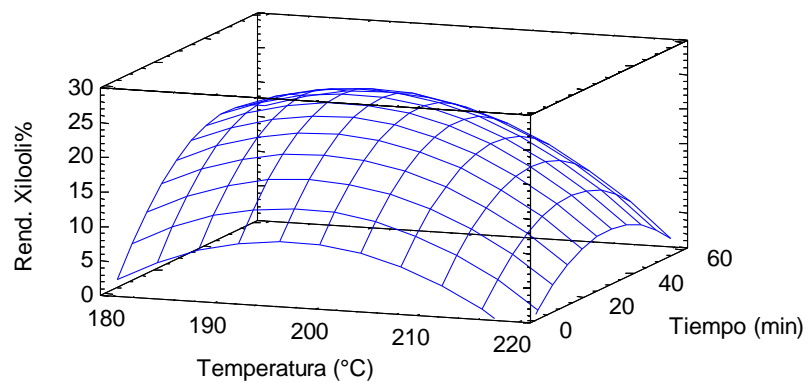


Figura 4-8: Superficie respuesta Rendimiento xilooligómeros vs. Temperatura y tiempo.

Coeficiente de correlación

$$R^2 = 80.22\%$$

Rendimiento Arabinooligómeros

Ecuación

$$\varphi_{Arabinooli} = -1657.5093 + 15.8554 * T + 5.9334 * t - 0.0369 * T^2 - 0.0328 * T * t + 0.0082 * t^2$$

Valor óptimo: 34.99% cuando $t = 10\text{min}$ y $T = 210.25^\circ\text{C}$

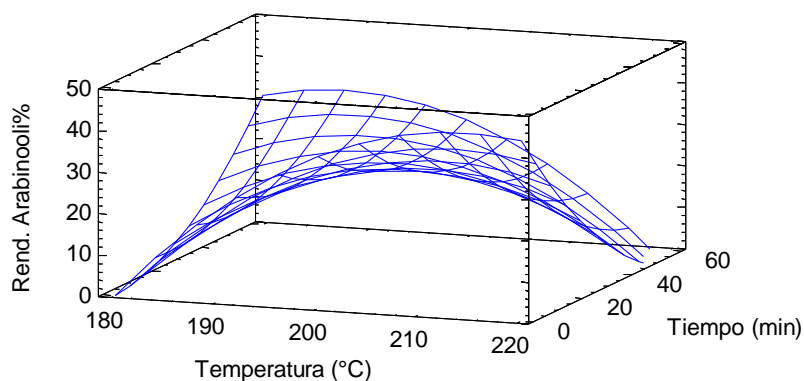


Figura 4-9: Superficie respuesta Rendimiento arabinooligómeros vs. Temperatura y tiempo.

Coeficiente de correlación

$$R^2 = 66.04 \%$$

De los modelos hallados para construir los gráficos de superficie y contorno, el de arabinooligómeros es que el menos porcentaje explica de la variabilidad del rendimiento de estos por la variabilidad de la temperatura y el tiempo. Los demás explican alrededor del 80%.

Por su recalcitrancia en el pretratamiento y la imposibilidad de degradación durante la hidrólisis enzimática, la glucosa presenta los mejores rendimientos a la más alta temperatura evaluada, es decir, 220°C y tiempos intermedios (32 min). A mayores tiempos parece que ocurrieran efectos de deposición de lignina sobre la celulosa evitando el contacto de esta con la enzima.

Sobre la xilosa y arabinosa se presenta mayor degradación por el pretratamiento y los mejores rendimientos se obtienen a temperaturas inferiores en comparación con la glucosa. Mientras la arabinosa presenta el mejor rendimiento a 185°C y 60min, la xilosa lo exhibe a 200 °C pero a tiempos inferiores, alrededor de 12 min.

Así mismo, los oligómeros se generan a partir de polímeros pero a la vez se degradan, permitiendo observar funciones en forma de domo que en el caso de los xilooligómeros su mayor rendimiento se encuentra a 193 °C y 41 min, mientras que los arabinooligómeros lo alcanzan a 210 °C y 10 min.

Los óptimos encontrados para cada compuesto evaluado, se encuentran en la región explorada a partir del diseño inicial, lo que sugiere que es adecuado llevar a cabo un estudio cinético considerando diferentes y más niveles, en caso de requerirse más detalle, dentro de los rangos establecidos.

A las condiciones en que el rendimiento de glucosa fue mayor después de la hidrólisis, se realizaron tres procesos completos pero a mayor escala utilizando un reactor de pretratamiento de 300 ml con agitación. Variaciones en el tiempo de calentamiento de aproximadamente 20 min hasta alcanzar 220°C en el centro del reactor, hacen que los resultados no sean iguales (Figura 4-10). Sin embargo, se evidencia a partir del balance completo la degradación de la hemicelulosa a sustancias diferentes a las medidas en un 54.59%. Presumimos que dichas sustancias son húmicas y se definirán en la sección 4.6.

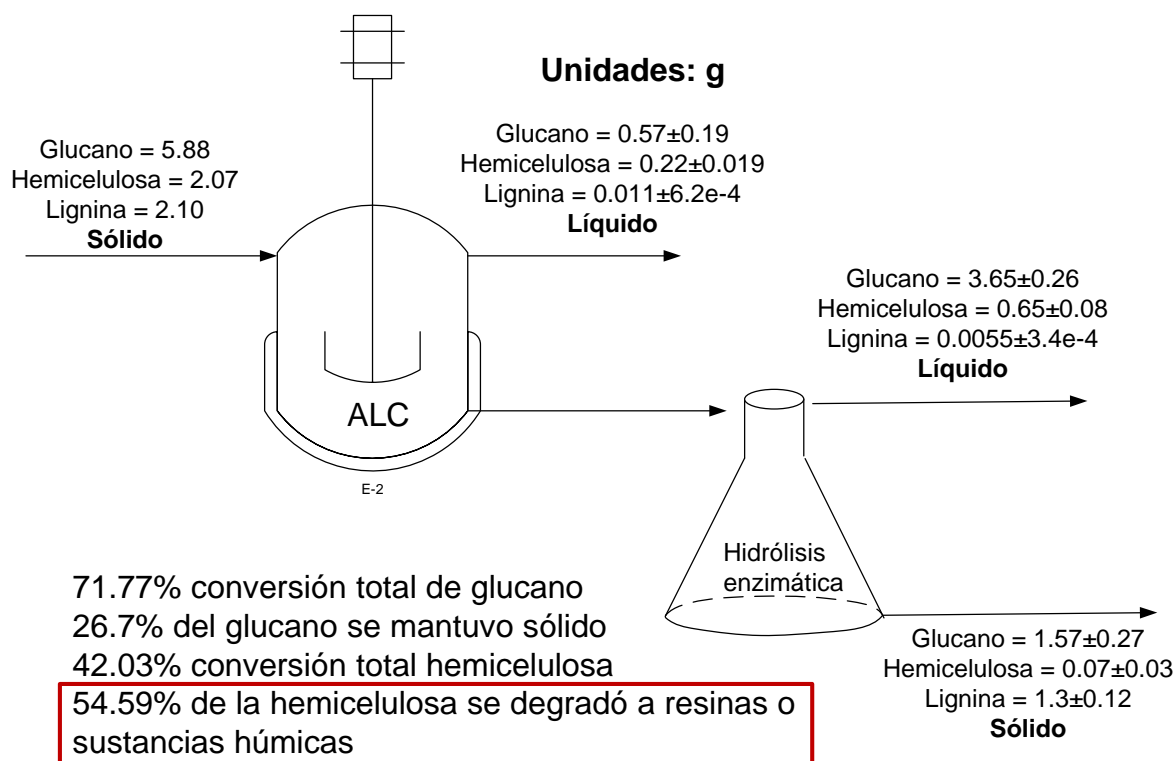


Figura 4-10: Balance total punto óptimo, 220°C y 30min por triplicado.

4.4 Efecto del pretratamiento

Antes que la fracción celulósica pueda ser usada como sustrato para la producción de etanol, esta debe ser separada de la envoltura hemicelulosa-lignina permitiendo que el área efectiva para las celulasas se incremente (Velásquez-Arredondo et al., 2010). El pretratamiento con ALC ayuda a alcanzar esto, a través de la liberación de la hemicelulosa la cual es solubilizada en oligosacáridos o monosacáridos o una mezcla de ambos. Además, ácido acético también es liberado debido a que la hemicelulosa es acetilada Figura 4-11: pH a temperatura ambiente después del pretratamiento.

Dependiendo de las condiciones del pretratamiento con ALC, se pueden formar productos de degradación derivados de los azúcares, sin embargo los cortos tiempos y el no requerimiento de reactivos además de agua lo hacen económicamente atractivo.

La glucosa, xilosa y arabinosa son fermentados por levaduras recombinantes y este trabajo está enfocado en el pretratamiento, buscando el mayor rendimiento posible de azúcares C5 y C6 (Taherzadeh & Karimi, 2007).

El alto pH inicial de 9 en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** (a –c) se debe a los compuestos alcalinos presentes en el raquis fresco. Estos compuestos alcalinos combinados con la presencia de grupos acetil resulta en un efecto búfer sobre la solución del pretratamiento manteniendo el pH en un valor entre 4 y 7 para tiempos de pretratamiento mayores a 5 min. Se ha encontrado que las pentosas son degradadas rápidamente hacia resinas a pH 7 (Lu, 2008). A pHs cerca a 4, la solubilización de la hemicelulosa en oligómeros es favorable (Y. Kim, Mosier, & Ladisch, 2008; Zeng et al., 2007a). Esto junto con la baja carga de sólidos son las razones por las cuales azúcares monoméricos como xilosa y arabinosa fueron hallados en pequeñas cantidades y otros compuestos como furfural, no fueron observados. Sin embargo, oligosacáridos fueron encontrados en el líquido y se degradaron bajo condiciones más severas, es decir, a más altas temperaturas y mayores tiempos de reacción (Figura 4-12 a-f).

El rendimiento es definido como el producto recuperado, comparado con la cantidad estequiométrica de producto que pudiera ser producido a partir del sustrato inicialmente disponible. Xilosa y arabinosa a partir de xilano y arabano, respectivamente, mientras que furfural por la contribución de los dos. Cuando el pH inicial se ajustó de 9 a 2.5 usando ácido sulfúrico, el rendimiento de furfural detectado fue equivalente a 1 y 1.5% con el pretratamiento a 200 °C después de 30 y 60 min mientras que a 220 °C los rendimientos fueron 0.66, 1.63, 1.22 y 1.23% cuando 10, 20, 30 y 60 min han transcurrido (datos no mostrados).

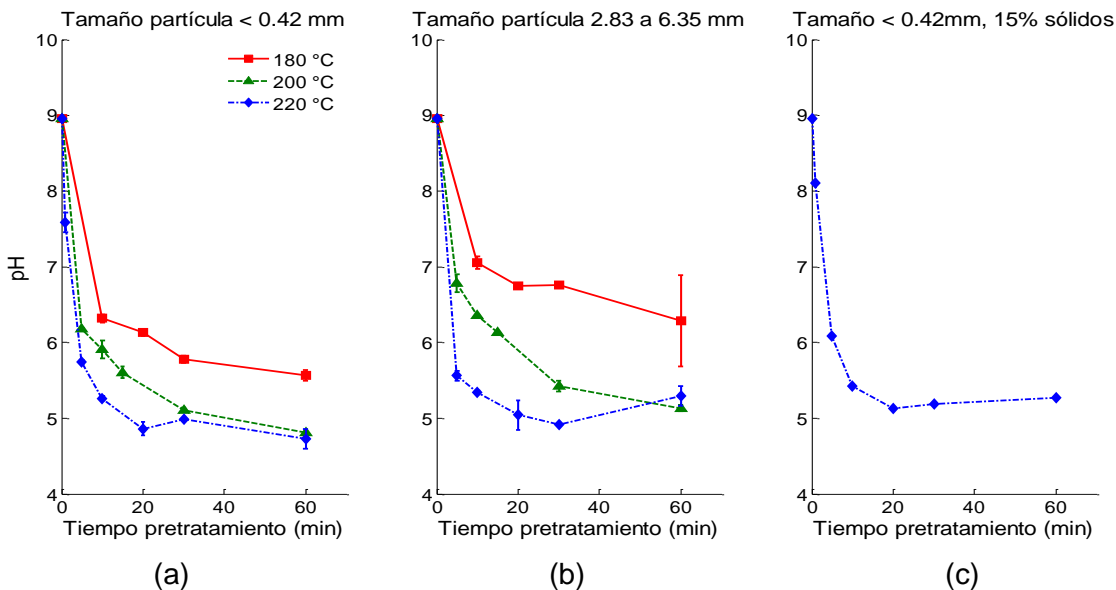


Figura 4-11: pH a temperatura ambiente después del pretratamiento.

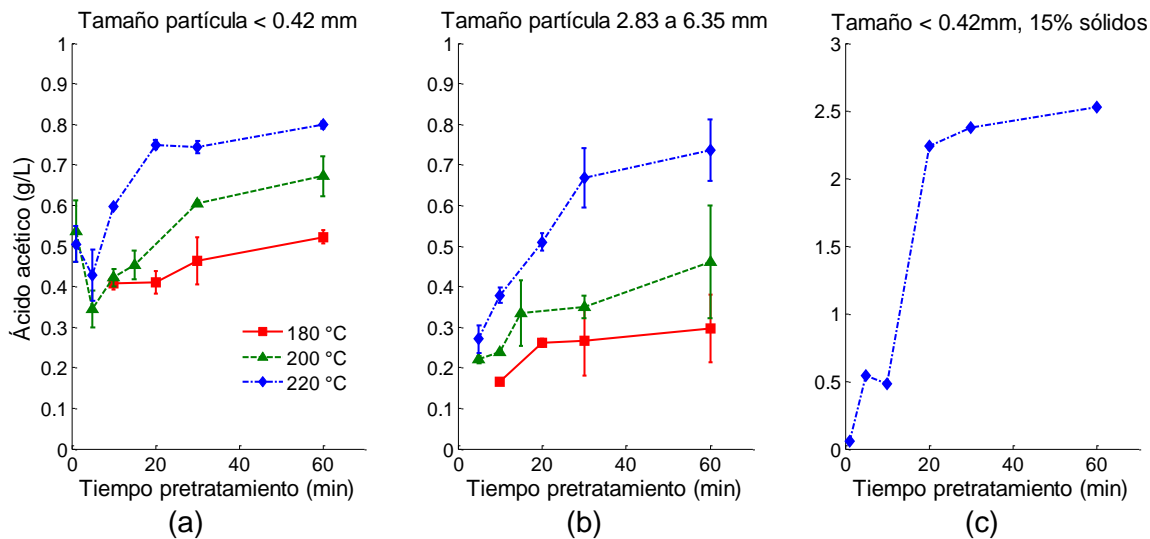


Figura 4-12: Concentración ácido acético después del pretratamiento.

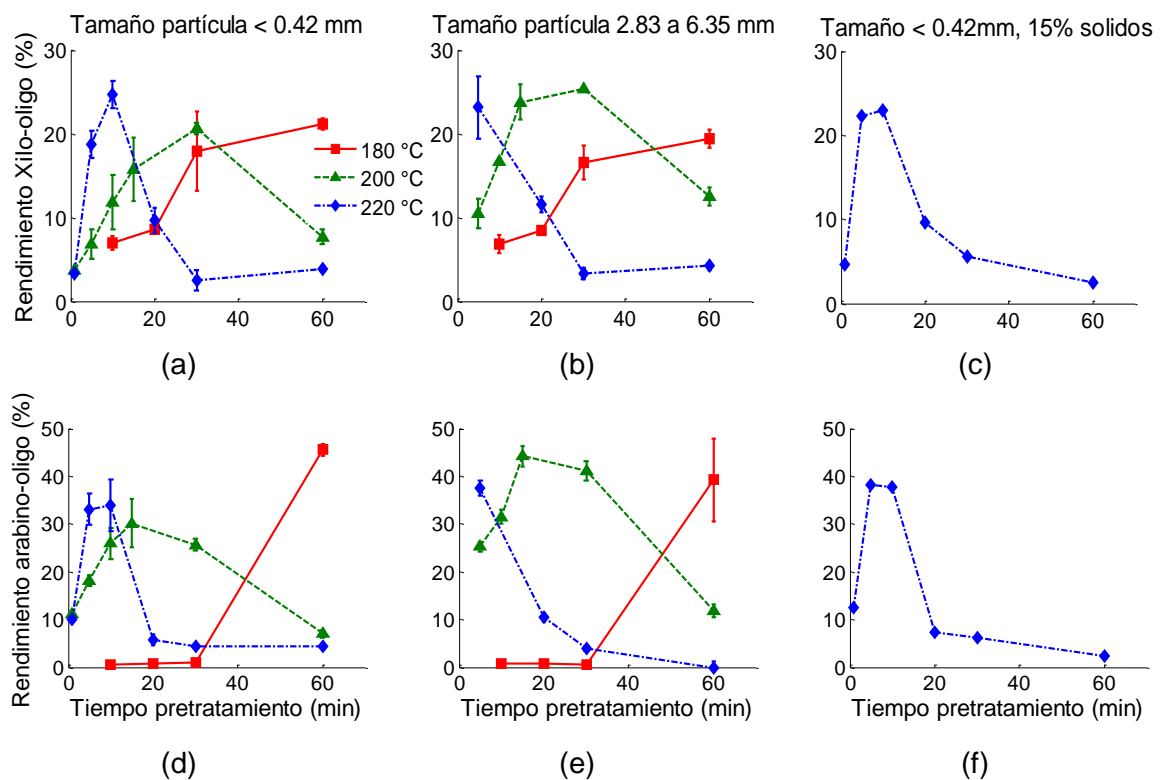


Figura 4-13: Solubilización de hemicelulosa en oligómeros.

La celulosa no fue degradada y se solubilizó en menos de 3.5% correspondientes a la glucosa y glucooligómeros (Figura 4-14), lo cual es ideal para el pretratamiento implementado, sin embargo hubo un efecto estructural en cuanto a la abertura y rompimiento de las fibras de celulosa presente en las paredes de las células de este material, lo cual se corrobora en la Figura 4-15, al comparar los productos de hidrólisis sin y con pretratamiento.

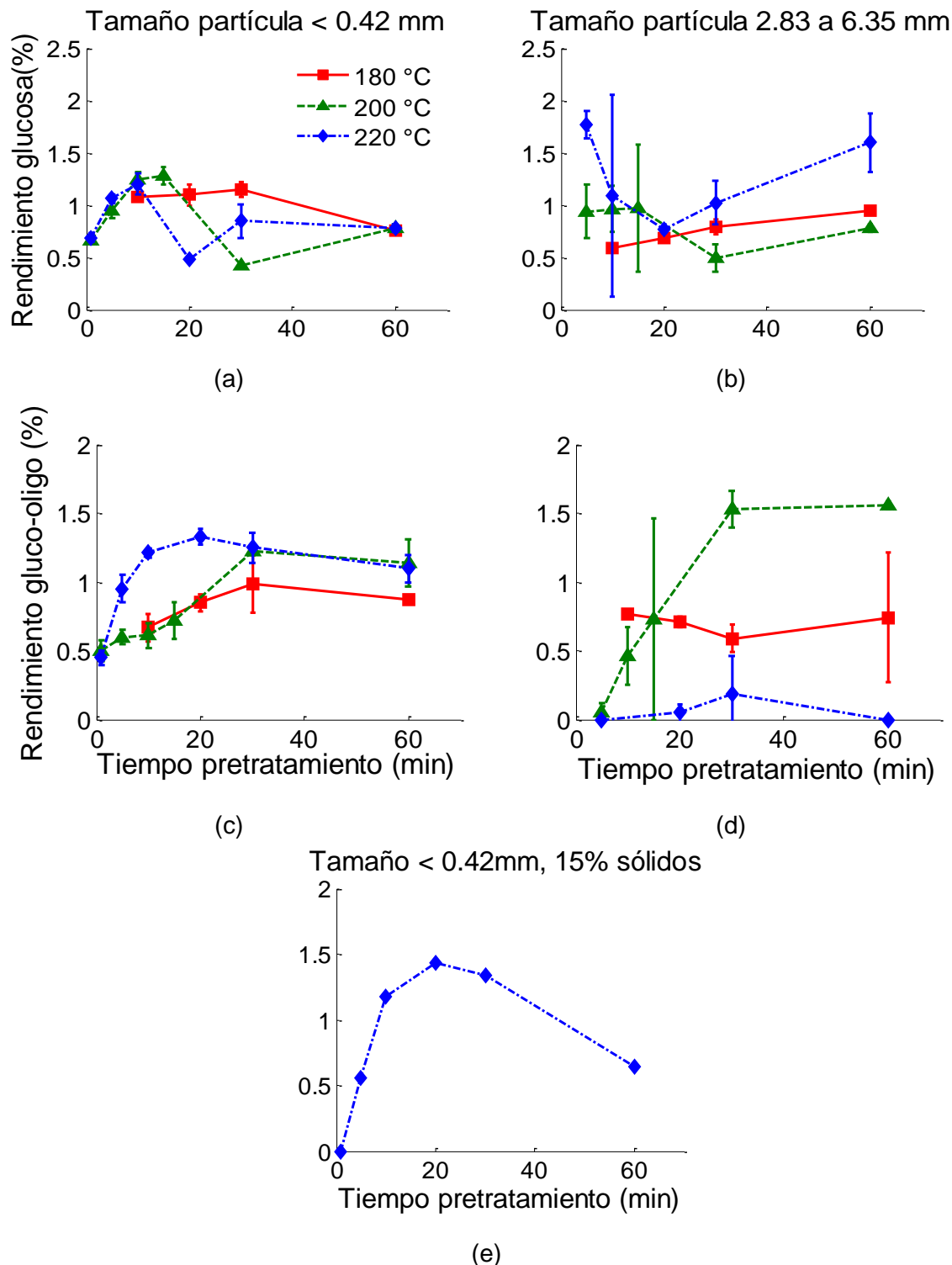


Figura 4-14: Solubilización de glucano en monómeros y oligómeros.

En trabajos anteriores, el máximo rendimiento de xilooligómeros fue 8g/100g de madera maple después de 60 min a 160°C mientras que la concentración de xilosa y furfural fue

2g y menos que 0.4 g respectivamente (Mittal et al., 2009b). Otro estudio muestra que la máxima cantidad de xilooligosacáridos liberado de barley husks fue obtenido después de 0.66 h (Garrote, Domí, & Parajo, 2004). Aunque estos resultados reportados previamente son similares a este trabajo desde un punto de vista de la severidad (Figura 4-12 a-f) no se puede comparar la subsecuente hidrólisis de la celulosa porque el interés de ellos era solo la autohidrólisis.

4.5 Digestibilidad enzimática

Las enzimas comerciales utilizadas parecen tener actividades además de la celulasa y β -glucosidasa tales como arabinasa y xilanasa porque la cantidad de estos azúcares es mayor que la obtenida después del pretratamiento, incluso en forma oligomérica, lo cual se observa al comparar el rendimiento en oligómeros (Figura 4-12) con el de monómeros después de la hidrólisis enzimática (Figura 4-15).

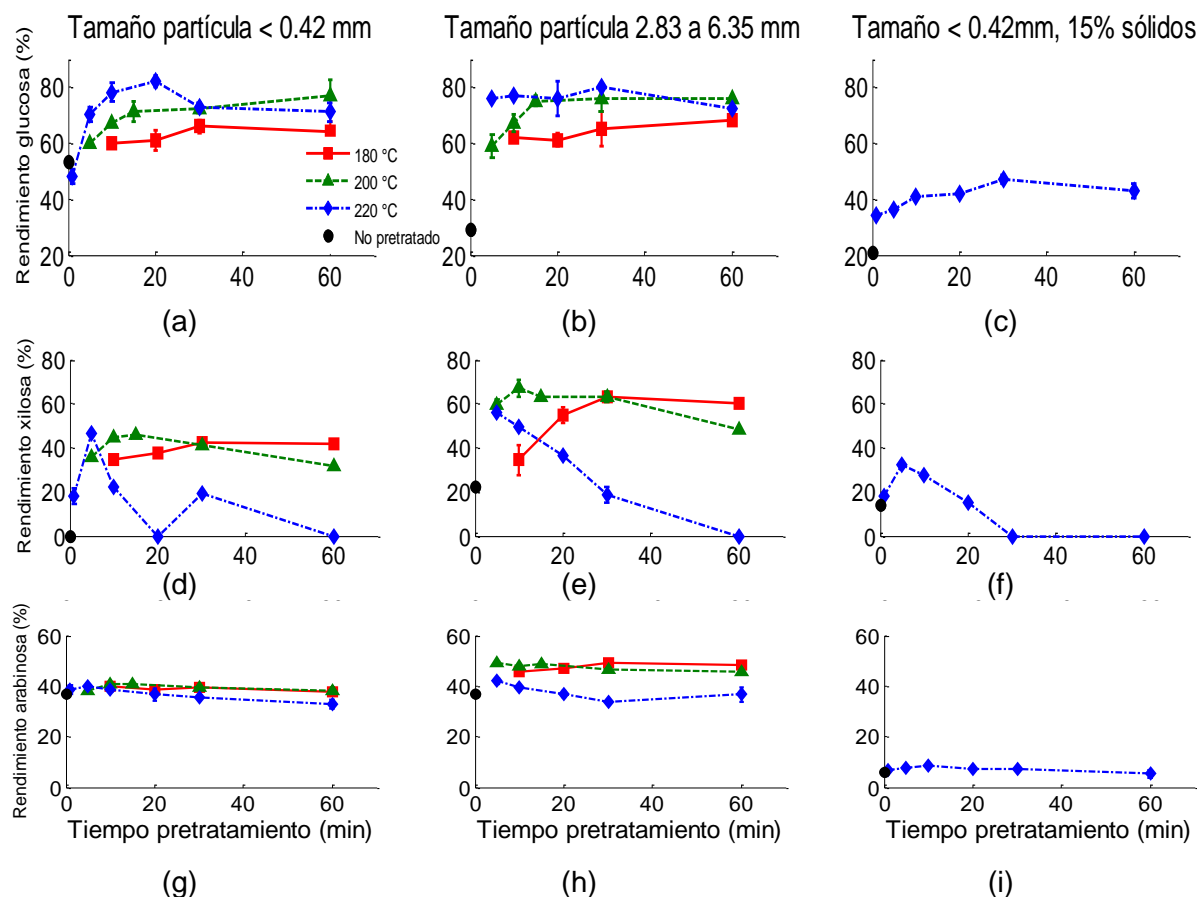


Figura 4-15: Rendimiento total de azúcares después del pretratamiento y la hidrólisis enzimática.

Aunque no hubo gran cantidad de glucosa y tampoco productos de degradación de la glucosa como el HMF y el ácido levulínico en la fracción líquida después del pretratamiento (Figura 4-14), el rendimiento de glucosa después de la hidrólisis enzimática del glucano pretratado es reducido a largos periodos de pretratamiento y altas temperaturas (Figura 4-15a-b). Este comportamiento se puede deber a otros compuestos tales como sustancias húmicas producidas a partir de pentosas y lignina fundida que cubre la celulosa remanente y previene la interacción celulosa-enzima (Donohoe, Decker, Tucker, Himmel, & Vinzant, 2008; Wahlgren & Arnebrant, 1991). Otra explicación podría ser la inhibición de la celulasa y/o β -glucosidasa por compuestos fenólicos provenientes de la lignina durante el pretratamiento hidrotérmico (Li et al., 2010) porque el material pretratado no fue lavado antes de la hidrólisis enzimática.

Parece que la temperatura es más importante que el tiempo porque los mayores cambios en la hidrólisis enzimáticas son observados a diferentes temperaturas Figura 4-15. El patrón observado en la Figura 4-15(d-i) además muestra que la xilosa es más sensible que la arabinosa a condiciones más severas. Lo mismo fue mencionado por Taherzadeh & Karimi (2007) y observado por Kootstra, Mosier, Scott, Beftink, & Sanders (2009). No se observaron diferencias significativas debidas al tamaño de partícula en el rendimiento de glucosa (Figura 4-15a-b). Esto puede ser debido al hecho mencionado en el trabajo de Mittal, Chatterjee, Scott, & Amidon (2009b), que un efecto notable de esta variable sobre el pretratamiento debería ocurrir a diámetros de partículas mayores a 8 mm como consecuencia de la limitación de la transferencia de masa dentro de la partícula. Mejores rendimientos a oligosacáridos a mayores tamaños de partícula (Figura 4-15d-e y g-h) se pueden deber a las diferencias en el el empaado de los reactores y a la mayor facilidad de los sólidos finos para ser humectados. Esto es análogo a la menor solubilización de hemicelulosa obtenida por Cara et al. (2008) cuando ellos impregnaron la materia prima con agua o ácido sulfúrico antes del pretratamiento.

Con respecto a la carga de sólidos, a mayor cantidad, es más pobre la transferencia de masa y más bajo el rendimiento a azúcares (Figura 4-15c, f, i). Además en este trabajo solo se evaluó el efecto con el menor tamaño de partícula el cual es más fácil de humedecer trayendo como consecuencia la ya mencionada.

En general, mejores rendimientos de glucosa están correlacionados con la mayor solubilización de xilano y arabano (Figura 4-16) lo cual ocurre más rápido a 220°C (Figura 4-16a-b, d-e, g-h). Dichos valores disminuyen al aumentar la carga de sólidos (Figura 4-16c). A la misma temperatura se obtiene el máximo rendimiento de glucosa (82%,Figura 4-15a) mientras que la xilosa y arabinosa fueron muy degradadas. Sus mayores rendimientos fueron 67% y 49.3% a 200°C y 10 y 5 min respectivamente.

Las condiciones óptimas se acercan a las reportadas para desechos de la producción agrícola de maíz y switchgrass, correspondientes a 190°C, 15min (Zeng, Mosier, Huang, & Sherman, 2007b) y 200°C y 10min (Y. Kim, Mosier, & Ladisch, 2008), pero rendimientos de glucosa por debajo del 70% en ambos casos.

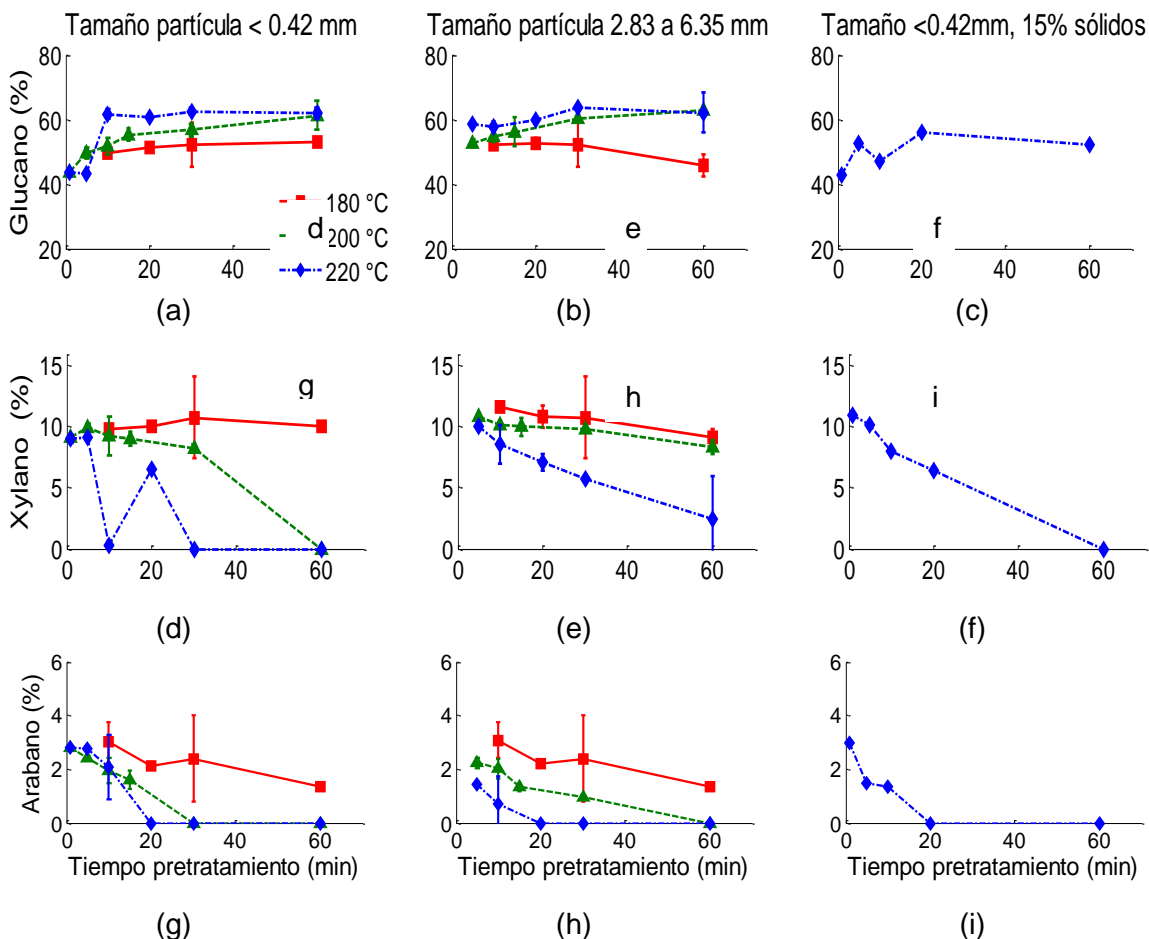


Figura 4-16: Composición del sólido remanente después del pretratamiento.

4.6 Ajuste del modelo

Con el fin de hallar los parámetros, se hizo un proceso de optimización a través del uso de la función `fmincon` de Matlab. Siguiendo la recomendación de normalizar o expresar las concentraciones de 0 a 1, al usar este tipo de funciones, sugerida por Girisuta et al. (2006), se ajustaron k_{0i} , n_i , E_{ai} con $i = 1, 2, 3, 4$ presentados en la Ecuación (3-16). Por tal razón se escogieron para el ajuste las ecuaciones (3-11) y (3-15) correspondientes a funciones de dependencia de la concentración de oligosacáridos y monosacáridos del tiempo, respectivamente, pero expresadas en términos del rendimiento. Dado que no hay un efecto significativo del tamaño de partícula en la producción de glucosa después de la hidrólisis enzimática Tabla 4-4 y que los mejores rendimientos o menor degradación de

polisacáridos se dio en el mayor rango de tamaños de partícula, se escogió este para modelamiento.

El mismo modelo y procedimiento fue usado para describir la solubilización de xilano y arabano los cuales representan a los polisacáridos presentes en el raquis de banano Tabla 4-2 y así poder cumplir con el objetivo general de modelar la producción de todos los azúcares durante el pretratamiento. La idea es que el mismo modelo refleje las etapas limitantes o las que no se presentan.

Aunque se tienen las concentraciones de gluco-oligómeros y glucosa, no se estudiará la solubilización de glucano dado que el interés del pretratamiento consiste en aislar la hemicelulsa de esta fracción y conservarlo en cuanto a cantidad, aunque como se explicó anteriormente, pueda sufrir alteraciones macro-estructurales. Además sus rendimientos conjuntos no rebasan el 3.5%.

A continuación se muestran los resultados del ajuste y el correspondiente coeficiente de correlación R^2 cuyos valores a partir de 0.8 han sido aceptados en estudios anteriores (Gámez et al., 2006), incluso hay estudios donde simplemente reportan $R^2 < 0.9$ sin mostrar la equivalencia (Ya, Romani, Garrote, Alonso, & Parajo, 2009).

Tabla 4-5: Estimación parámetros cinéticos para la solubilización de xilano, modelo 1.

Parámetro	Estimación
$k_{01}(\text{mol}^{-n_1}\text{min}^{-1})$	$3.42 \cdot 10^5$
$k_{02}(\text{mol}^{-n_2}\text{min}^{-1})$	$1.42 \cdot 10^3$
$k_{03}(\text{mol}^{-n_3}\text{min}^{-1})$	7.95
$k_{04}(\text{mol}^{-n_4}\text{min}^{-1})$	$3.16 \cdot 10^3$
n_1	0.45
$n_2,$	1
$n_3,$	$1 \cdot 10^{-4}$
n_4	0.34
$E_{a1}(\text{J mol}^{-1})$	$3.9 \cdot 10^4$
$E_{a2}(\text{J mol}^{-1})$	$3 \cdot 10^4$
$E_{a3}(\text{J mol}^{-1})$	$2 \cdot 10^4$
$E_{a4}(\text{J mol}^{-1})$	$2.44 \cdot 10^4$

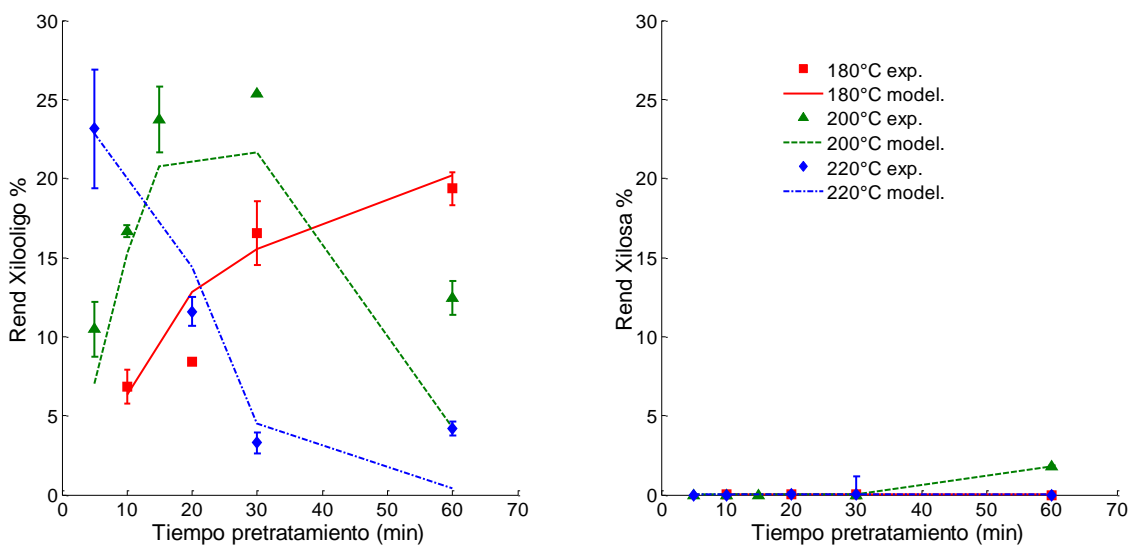
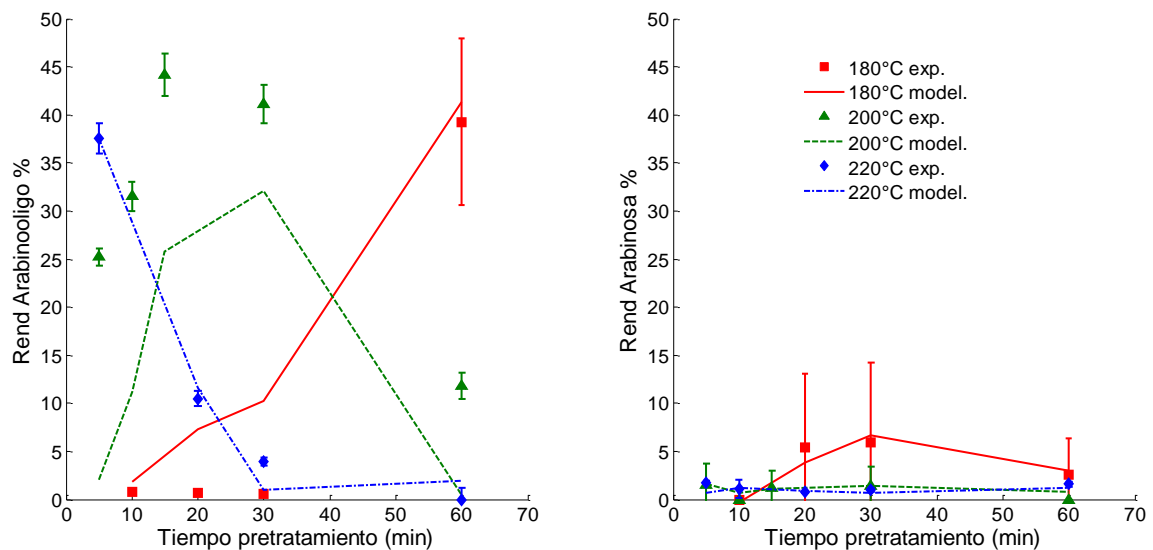
**Figura 4-17:** Correlación perfiles de concentración solubilización xilano, modelo 1

Tabla 4-6: Estimación parámetros cinéticos para la solubilización de arabano, modelo 1.

Parámetro	Estimación
$k_{01}(\text{mol}^{-n_1}\text{min}^{-1})$	$4 \cdot 10^6$
$k_{02}(\text{mol}^{-n_2}\text{min}^{-1})$	0.46
$k_{03}(\text{mol}^{-n_3}\text{min}^{-1})$	$1.29 \cdot 10^4$
$k_{04}(\text{mol}^{-n_4}\text{min}^{-1})$	$5.69 \cdot 10^4$
n_1	1.17
$n_2,$	0.01
$n_3,$	0.9
n_4	1.01
$E_{a1}(\text{J mol}^{-1})$	$9.84 \cdot 10^3$
$E_{a2}(\text{J mol}^{-1})$	$2.22 \cdot 10^4$
$E_{a3}(\text{J mol}^{-1})$	$1.84 \cdot 10^4$
$E_{a4}(\text{J mol}^{-1})$	$5.32 \cdot 10^3$

**Figura 4-18:** Correlación perfiles de concentración solubilización arabano, modelo 1.

Los procesos de hidrólisis y autohidrólisis de polisacáridos son endotérmicos ya que básicamente estos tratamientos se enfocan en el rompimiento de enlaces. Las energías de activación comúnmente reportadas corresponden a la de formación y degradación de

xilosa por encontrarse en mayor cantidad en las especies vegetales lo que implica que solamente su solubilización ya tiene efectos importantes sobre el pretratamiento.

En el caso de la formación y degradación de xilosa en procesos de autohidrólisis, los modelos no consideran la concentración de protones por ser de orden cercano a cero. Los hallados en este trabajo están entre 0 y 1.17. Las energías de activación reportadas son las siguientes $E_{a1} = 117 \text{ kJ/mol}$, $E_{a2} = 93.5 \text{ kJ/mol}$, $E_{a3} = 100.8 \text{ kJ/mol}$ para el caso de madera de maple (Mittal et al., 2009b) y $E_{a1} = 216 \text{ kJ/mol}$, $E_{a2} = 146 \text{ kJ/mol}$, $E_{a3} = 83 \text{ kJ/mol}$ concerniente a Barley Husks (Garrote et al., 2004). Estos datos están distantes de los estimados en este trabajo en el que todas las energías de activación están por debajo de 40 kJ/mol . Las explicaciones a este tipo de diferencias radican en la composición y capacidad de neutralización de las materias primas (Mittal et al., 2009b) y a que a pHs mayores a 5 las velocidades de degradación, especialmente a sustancias húmicas aumentan considerablemente (Figura 4-19) lo que implica un mayor poder catalizador o mayor disminución en la energía de activación tal como sucede con el raquis de banano (**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Las sustancias húmicas son sólidos oscuros aglomerados de forma redondeada con diámetros que oscilan entre 5 y 10 μm (Buana Girisuta, 2007) y es la coloración después del pretratamiento (Figura 4-19) lo que justifica su producción en este trabajo.

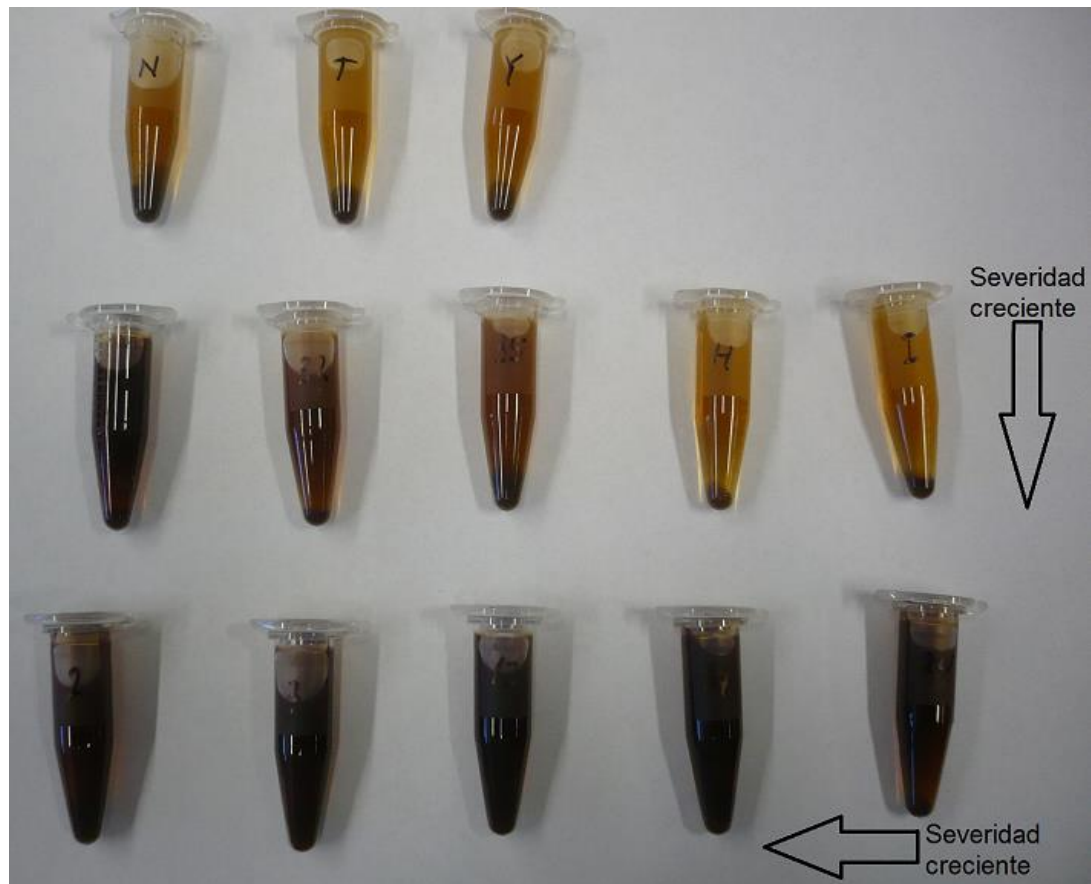


Figura 4-19: Color muestras pretratadas Indicativo de presencia de sustancias húmicas.

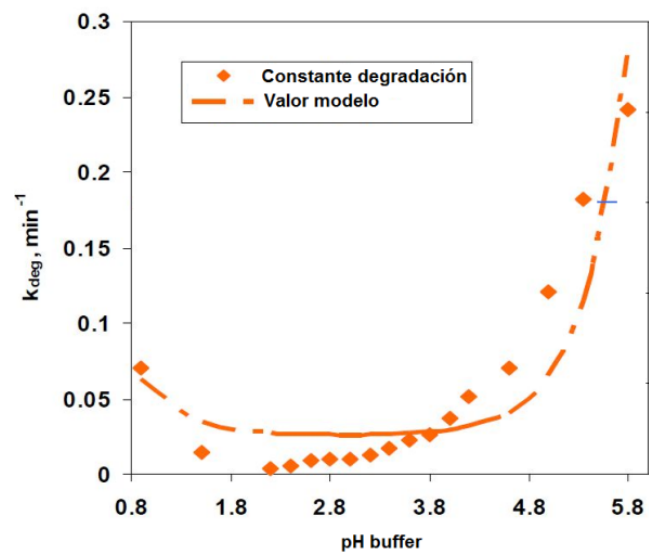


Figura 4-20: Velocidad de degradación de xilosa vs. pH (Lu, 2008).

Para el caso de la arabinosa, solo se cuenta con un estudio a condiciones ácidas en el que se utilizó ácido fumárico, maleico y agua a 150 y 170°C pero solo se consideró la degradación de arabinosa y se halló una constante cinética global sin expandirla con el fin de encontrar las energías de activación. Sin embargo, dado que la xilosa proviene de la misma matriz y tiene características estructurales similares se espera que las energías para ambas sean similares o incluso mayores las de la xilosa (Taherzadeh & Karimi, 2007) tal como se aprecia al comparar las Tabla 4-5 y Tabla 4-6.

Las energías reportadas para la ruta de solubilización de xilano son del mismo orden de magnitud y desde este punto es difícil concluir respecto al manejo de las temperaturas, a excepción de la que representa la degradación a sustancias húmicas pasando solamente por los oligómeros, sin embargo, para el caso del arabano, a mayor temperatura se favorece la formación de arabinosa y sustancias húmicas a partir de los arabino-oligosacáridos por presentar los mayores valores de esta propiedad.

Los factores pre-exponenciales estimados k_{02} relacionados con el paso de oligómeros a monómeros para el caso de solubilización de arabano indican que esta es la etapa más lenta, al igual que el paso de xilosa a sustancias húmicas y es muy probable que no se den. Esto sugiere que la mayoría de oligosacáridos están pasando a resinas o sustancias húmicas por efecto de compuestos o sales presentes en el raquis (Baugh & Mccarty, 1986; Lu, 2008).

Aunque el modelo no se ajusta correctamente a los datos experimentales de los xilo y arabino-oligosacáridosa 200°C, la máxima concentración presentada por este concuerda con el tiempo de 15min en ambos casos. Por tanto, se considera que el proceso de optimización derivando la Ecuación (3-10) e igualándola a cero, además de evaluarla a 200°C, permite predecir el tiempo de operación al que se logra dicho máximo posibilitando la prevención de la posterior degradación. Se han reportado estudios donde se conserva la tendencia pero no el ajuste con diferencias en los rendimientos hasta del 15%, tal es el caso de la Fig. 4 en el trabajo de Chuan-min, Yong-jie, Zheng-wei, Ting-chen, & Jian-qin (2004).

Dado que las funciones ensayadas (fmincon, fminunc, fminsearch de Matlab) convergen a mínimos locales y por tanto dependen de los valores iniciales supuestos que se deben

ingresar como requisito del método numérico de solución, se decidió buscar valores iniciales de los parámetros a partir de la solución del modelo para cada temperatura individualmente. Sin embargo no se obtuvo un mejor resultado. Otra medida fue la proposición de otra ruta de solubilización de arabano a partir de la adición de una etapa que considera la producción de arabinosa a partir de arabano (Figura 3-5), debido a que a 180°C, a los 20 y 30min ya hay presencia de arabinosa mientras que de arabino-oligómeros no. El mejor resultado para este modelo 1, es muy similar al que se observa en la Figura 4-18 para el modelo 2, incluso, E_{a5} , n_5 fueron iguales a cero y la solubilización directa en forma de xilosa es lineal y equivalente a $k_{05} = 0.0024$.

Tabla 4-7: Estimación parámetros cinéticos para la solubilización de arabano, modelo 2.

Parámetro	Estimación
$k_{01}(\text{mol}^{-n_1}\text{min}^{-1})$	$4*10^6$
$k_{02}(\text{mol}^{-n_2}\text{min}^{-1})$	$7.92*10^7$
$k_{03}(\text{mol}^{-n_3}\text{min}^{-1})$	$1.26*10^4$
$k_{04}(\text{mol}^{-n_4}\text{min}^{-1})$	$5.98*10^4$
$k_{05}(\text{mol}^{-n_5}\text{min}^{-1})$	0.0024
n_1	1.3
$n_2,$	1.6
$n_3,$	0.8
n_4	0.9
n_5	$1*10^{-4}$
$E_{a1}(\text{J mol}^{-1})$	$2.98*10^3$
$E_{a2}(\text{J mol}^{-1})$	$1.38*10^4$
$E_{a3}(\text{J mol}^{-1})$	124.84
$E_{a4}(\text{J mol}^{-1})$	$1.17*10^4$
$E_{a5}(\text{J mol}^{-1})$	$1*10^{-4}$

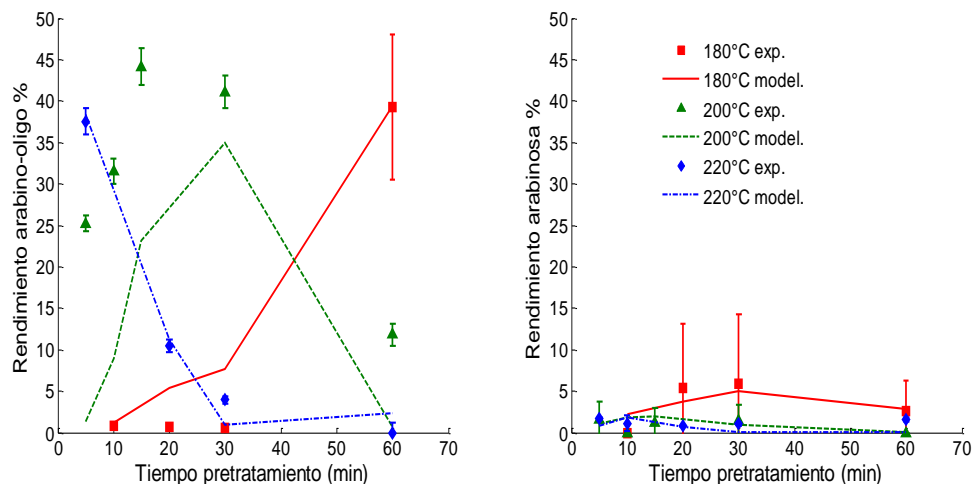


Figura 4-21: Correlación perfiles de concentración solubilización arabano, modelo 2.

Aunque las constantes fueron ajustadas utilizando los datos de rendimiento a todas las temperaturas a la vez, a través de un proceso de optimización, el coeficiente de correlación se halló para cada temperatura considerando el valor predicho y el experimental. Se pudo calcular considerando todas las temperaturas a la vez, sin embargo, se dificulta en el sentido que no todos los tiempos son los mismos.

Tabla 4-8: Coeficiente de correlación.

Compuesto	Modelo	Temperatura (°C)	R²
Xilo-oli	1	180	0.84
Xilo-oli	1	200	0.88
Xilo-oli	1	220	0.92
Xilosa	1	180	0.65
Xilosa	1	200	1.00
Xilosa	1	220	0.42
Arabino-oligo	1	180	0.96
Arabino-oligo	1	200	0.82
Arabino-oligo	1	220	0.98
Arabinosa	1	180	0.87
Arabinosa	1	200	0.86
Arabinosa	1	220	0.02
Arabino-oligo	2	180	0.98
Arabino-oligo	2	200	0.72
Arabino-oligo	2	220	0.98
Arabinosa	2	180	0.84
Arabinosa	2	200	0.06
Arabinosa	2	220	0.02

En la Tabla 4-8 las peores regresiones están asociadas al ajuste de los monómeros, lo que se puede explicar por las muy bajas concentraciones y en algunos casos, desviaciones del orden de 8% (Figura 4-18 y Figura 4-21). Además, se puede apreciar que el modelo 1 explica mejor la solubilización de arabano que el modelo 2, lo que ratifica que la etapa 5 es innecesario considerarla.

Otro intento por mejorar el ajuste del modelo 1 a la ruta de solubilización de arabano, consistió en hallar los parámetros considerando cada temperatura individualmente. Con este procedimiento se logró mejorar la predicción del modelo en cuanto al rendimiento de arabino-oligómeros, tal como se aprecia en la Figura 4-22.

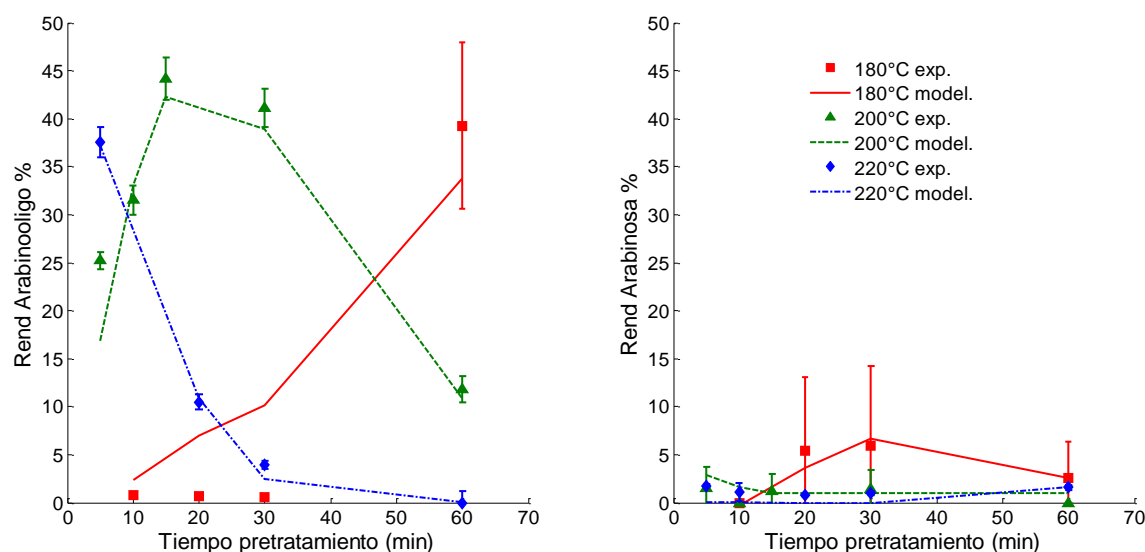


Figura 4-22: Correlación perfiles de concentración solubilización arabano, cada temperatura por separado.

Los parámetros que permitieron dicho acercamiento se muestran a continuación (Tabla 4-9).

Tabla 4-9: Estimación parámetros cinéticos para la solubilización de arabano, cada temperatura por separado.

Parámetro	180°C	200°C	220°C
$k_{01}(mol^{-n_1}min^{-1})$	111.56	0.24	0.60
$k_{02}(mol^{-n_2}min^{-1})$	$2.99 \cdot 10^3$	$4.01 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3$
$k_{03}(mol^{-n_3}min^{-1})$	$1 \cdot 10^3$	$1.74 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$
$k_{04}(mol^{-n_4}min^{-1})$	0.84	0.05	4.81
n_1	0.61	0.04	0.04
$n_2,$	0.95	0.85	0.99
$n_3,$	0.61	0.53	0.06
n_4	0.58	0	0.23
$E_{a1}(kJ mol^{-1})$	$2.99 \cdot 10^3$	$3.44 \cdot 10^3$	$3.7 \cdot 10^3$
$E_{a2}(kJ mol^{-1})$	$9 \cdot 10^3$	$8.19 \cdot 10^3$	$9.98 \cdot 10^3$
$E_{a3}(kJ mol^{-1})$	99.77	0	96.9983
$E_{a4}(kJ mol^{-1})$	$2 \cdot 10^3$	$2.08 \cdot 10^3$	$2.45 \cdot 10^3$

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

La composición del raquis de banano es promisorio en la producción de bioetanol dada la baja concentración de grupos acetilo y el alto contenido de celulosa en comparación con otros residuos agroindustriales comunes.

El pretratamiento ALC incrementa la digestibilidad enzimática del raquis de banano.

Se encontró que el raquis de banano contiene compuestos alcalinos que combinados con el ácido acético liberado a partir de las hemicelulosas favorece un efecto búfer manteniendo el pH entre 4 y 7.

Después del proceso enzimático, el rendimiento de pentosas fue mayor a tamaños de partícula más grandes, baja carga de sólidos, 200°C y tiempos alrededor de 5 a 10 min mientras que el mejor rendimiento total de glucosa (alrededor del 80%) se obtuvo a 220°C y tiempos entre 20 y 30min.

Un diseño multifactor multinivel demostró que los tamaños de partícula probados no interfieren con la hidrólisis enzimática de la celulosa y la optimización tomando solamente el mayor resultó en un rendimiento total de glucosa de 78.67% a 31.82min y 220°C, el de xilosa fue de 64.94% a 11.6min y 200°C, el total de arabinosa de 48.87% a 60min y 185.35°C mientras que los oligómeros exhibieron su mejor condición a 41.28min y 193°C, 10min y 210°C para aquellos derivados de xilano y arabano, respectivamente.

El mecanismo pseudohomogéneo de primer orden con dependencia de la temperatura y concentración de protones, que se propuso en este trabajo, permite predecir acertadamente la generación de oligosacáridos ($R^2 > 0.8$, Tabla 4-8) los cuales representan la forma de azúcares más abundante después del pretratamiento.

La catálisis por sustancias alcalinas y/o sales presentes en el raquis de banano, degradó los oligosacáridos a resinas o sustancias húmicas principalmente. Los altos factores pre-exponenciales en las etapas de conversión a sustancias húmicas y las bajas energías de activación en comparación con las reportadas en la literatura, confirman esta conclusión.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda probar las mejores condiciones para el rendimiento de glucosa pero lavando los sólidos después del pretratamiento con el fin de remover los compuestos fenólicos que se han reconocido tienen un efecto inhibitorio sobre la celulasa.

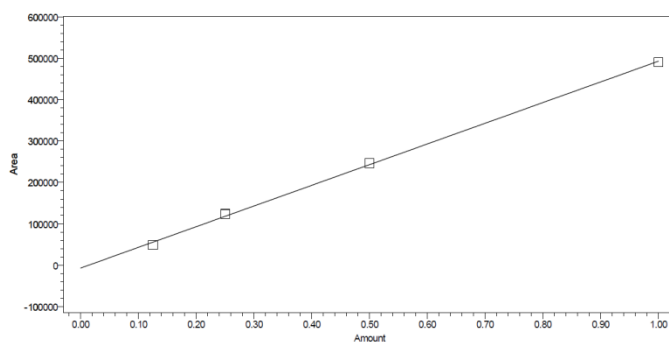
El enfoque de este trabajo fue el pretratamiento, sin embargo, es deseable hacer a futuro un estudio con el fin de comparar tiempos de reacción optimizando la hidrólisis enzimática.

Dado el alto pH inicial es conveniente utilizar un pretratamiento alcalino aunque de todas maneras hay ácidos de la biomasa que se solubilizan y tienden a neutralizar la solución.

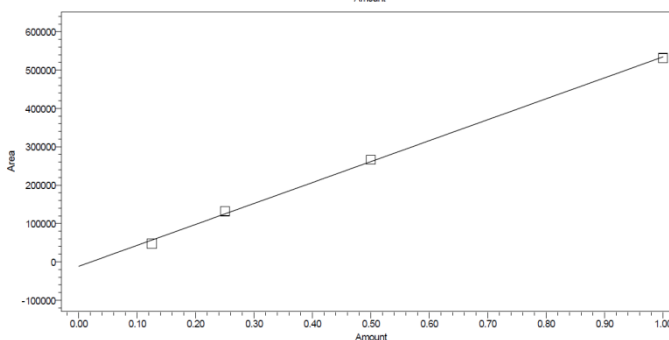
El modelo propuesto en este trabajo y las condiciones a baja escala, a las que se corrieron los experimentos, permiten predecir únicamente la cinética química. A nivel industrial, se hace necesario realizar un modelo que además de involucrar dicha velocidad de reacción, también tenga en cuenta los efectos de transferencia de masa y energía.

A. Anexo: Curvas de calibración HPLC

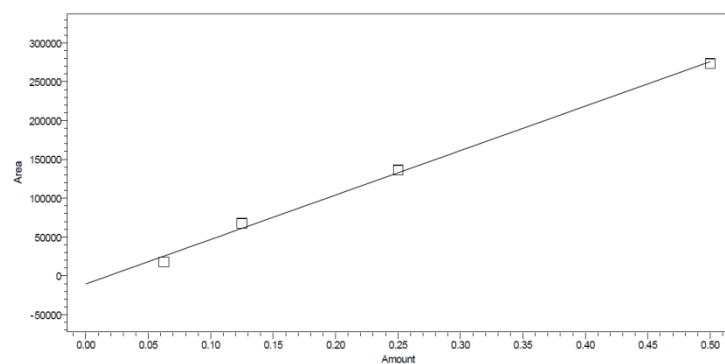
Se prepararon curvas de calibración con estándares de glucosa, xilosa, arabinosa, ácido acético, furfural y 5-hidroximetilfurfural (HMF) partiendo de una solución cuyo contenido era 1.0, 1.0, 0.5, 0.5, 0.5, 0.5 g/l respectivamente. Esta solución fue sometida a diluciones seriadas 1:2 utilizando ácido sulfúrico 5mM correspondiente también a la fase móvil.



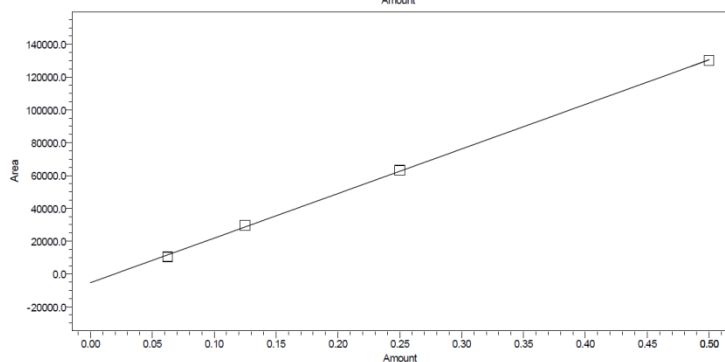
Glucosa



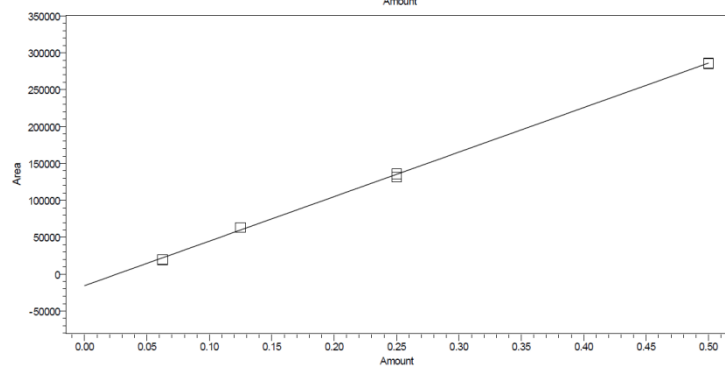
Xilosa



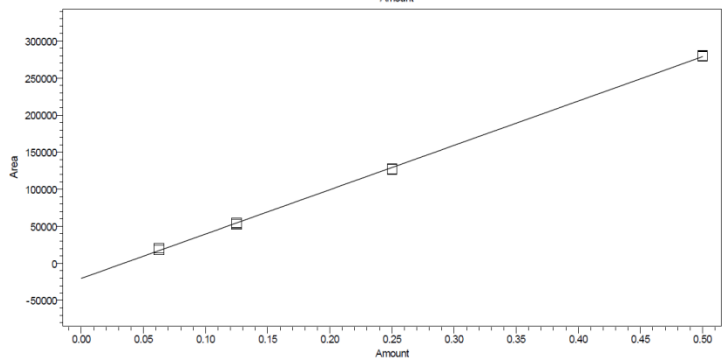
Arabinosa



Ácido acético



HMF



Furfural

Figura 5-1: Curvas de calibración HPLC.

B. Anexo: Ficha técnica celulasa

MATERIAL SAFETY DATA SHEET



Genencor International®

Product Name: **SPEZYME® CP**
Product Code: **A03117**

1. CHEMICAL PRODUCT AND COMPANY IDENTIFICATION

Product Name: **SPEZYME® CP**
Product Code: **A03117**
Chemical Family: **Enzyme Preparation**
Formula: **Not Applicable**
Synonyms: **Not Applicable.**



This product is distributed by Canada Colors and Chemicals Limited
General Inquiry Phone Number: (416) 449-7759
24 Hour Emergency Phone Number (416) 444-2112
CCC Product Code: **876240**
CCC Product Name: **SPEZYME CP FG <>**

MANUFACTURER/SUPPLIER: Genencor International, Inc.
200 Meridian Centre Blvd.
Rochester, NY 14618-3916
USA
(585) 256-5200
(800) 847-5311

2. COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS

HAZARDOUS PRODUCT COMPOSITION/CAS NUMBER	APPROX. WEIGHT PERCENT	ACGIH	OSHA
Cellulase (fungal) 9012-54-8	10 - 15	Not listed	Not Listed
Water 7732-18-5	Proprietary	Not listed	Not Listed
Sorbitol 50-70-4	Proprietary	Not listed	Not Listed
Sodium Chloride 7647-14-5	Proprietary	Not listed	Not Listed

3. HAZARDS IDENTIFICATION

EMERGENCY OVERVIEW: May cause mild irritation to eyes, skin, respiratory tract.
Primary Routes of Exposure: Inhalation, ingestion.
Ingestion: Not expected to be toxic by ingestion.
Eye Contact: May cause mild eye irritation.
Skin Contact: May cause mild skin irritation.
Inhalation: Information not available.
Potential Health Effects: Inhalation of enzyme mist/dust may cause allergic respiratory reactions, including asthma, in susceptible individuals on repeated exposure.
Aggravated Conditions: Pulmonary disorders.

4. FIRST AID MEASURES

Ingestion: Rinse mouth and throat thoroughly with water. If signs of irritation or toxicity occur, seek medical attention.
Skin Contact: Flush with copious amounts of water for at least 15 minutes. If irritation persists or signs of toxicity occur, seek medical attention. Provide symptomatic/supportive care as necessary.
Eye Contact: Flush with copious amounts of water for 15 minutes. If irritation persists or signs of toxicity occur, seek medical attention. Provide symptomatic/supportive care as necessary.

DATE OF MSDS PREPARATION: 01/20/2005
ANSI US Format

MATERIAL SAFETY DATA SHEET



Product Name: **SPEZYME® CP**
Product Code: **A03117**

Inhalation: Remove from source of exposure. If symptoms of irritation or respiratory allergy occur, seek medical attention. Provide symptomatic/supportive care as necessary.
Notes To Physician: May cause respiratory allergy.

5. FIRE FIGHTING MEASURES

NFPA 325 - Flash Points: °F: Not Determined °C: Not Determined
Flash Point Method: Not Determined.
Autoignition Temp: °F: Not Determined °C: Not Determined
Flammable Limits in Air: Lower (%): Not Determined Upper (%): Not Determined
Extinguishing Media: All standard firefighting media
Fire Fighting Procedures: Use extinguishing media suitable for surrounding materials. Wear adequate personal protection to prevent contact with material or its combustion products.

6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

Action to be taken if material is released or spilled: Use appropriate personal protection (see section 8). Provide for sufficient ventilation. Avoid contact with product. Avoid inhalation of product. Contain and remove spilled product by mechanical means or with a vacuum cleaner equipped with a high efficiency filter. Avoid generation of aerosols.

7. HANDLING AND STORAGE

Handling: Use appropriate personal protective equipment. Avoid breathing dust/mist and contact with the skin or eyes. Do not consume food, drink or smoke while handling this material.
Storage: (See product literature for additional information.)

8. EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION

Ventilation: Use only in well ventilated area.
Respiratory Protection: Use NIOSH approved dust respirator equipped with P100 filters.
Gloves: Appropriate chemical resistant gloves should be worn.
Eyes: Safety glasses (with side shields)
Other Personal Protection Data: NA

9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

Boiling Point:
°F: Not Determined
°C: Not Determined
Freezing Point:
°F: Not Determined
°C: Not Determined
Melting Point:
°F: Not Determined
°C: Not Determined
Vapor Pressure: Not Determined
ANSI US Format
DATE OF MSDS PREPARATION: 01/20/2005

MATERIAL SAFETY DATA SHEET



Product Name: **SPEZYME® CP**
Product Code: **A03117**

Vapor Density (Air=1):	Not Determined
Physical State:	Liquid
Color:	Amber
Odor:	Typical odor of fermented product.
pH:	4 - 7
Specific Gravity:	1.1 - 1.2 g/ml
Density:	Not Determined
Evaporation Rate:	Not Determined
Solubility in Water:	Not Determined

Molecular Weight: No Data

10. STABILITY AND REACTIVITY

Stability Data:	Stable under normal storage conditions.
Polymerization:	None anticipated
Hazardous Decomposition Products:	None anticipated
Conditions to Avoid:	None known
Materials to Avoid:	None anticipated

11. TOXICOLOGICAL INFORMATION

Acute Oral LD50 (mg/kg):	No data.
Acute Dermal:	No data.
Dermal Sensitization:	Not expected to be a dermal sensitizer.
Acute Inhalation LC50 (mg/l):	No data.
Subchronic Effects:	In a 90-day feeding study with rats, no evidence of toxicity was seen at levels up to 50,000 ppm. A NOEL can be established at 50,000 ppm. Data is based on studies with fungal cellulase.
Carcinogenicity:	Not classified as a carcinogen by IARC, OSHA, or NTP.
Genotoxicity:	Not mutagenic in Ames test in the presence or absence of S9 up to 5000 ug/plate. Negative in chromosomal aberration studies using human lymphocytes in the presence and absence of metabolic activation up to 5,000 ug/ml.
Reproductive/Developmental Toxicity:	Not expected to produce reproductive or developmental toxicity.
Other Information:	

12. ECOLOGICAL INFORMATION

Ecotoxicological Information:	No data
LC50 Freshwater species:	No data
LC50 Saltwater species:	No data
LC50 Daphnia Magna:	No data
LC50 Algae:	No data

Chemical Fate Information: The product is not believed to be dangerous to the environment with respect to mobility, persistence, degradability, bioaccumulative potential, aquatic toxicity, and other data relating to eco-toxicity.

DATE OF MSDS PREPARATION:

01/20/2005

ANSI US Format

MATERIAL SAFETY DATA SHEET



Product Name: **SPEZYME® CP**
 Product Code: **A03117**

13. DISPOSAL CONSIDERATIONS

Waste Disposal Method: Disposal should be made in accordance with federal, state and local regulations.

Packaging: If empty container retains product residues, all label precautions must be observed. Transport with all closures in place. Reuse or dispose of according to national or local regulations.

14. TRANSPORT INFORMATION

DOT:

DOT Status:	Not hazardous.
DOT Shipping Name:	None
DOT Reportable Quantity (lbs):	Not applicable.
DOT Packing Group:	Not applicable.

Harmonized Tariff Code for enzymes: 3507.90.7000

ICAO/IATA: Not applicable.
IMDG: Not applicable.

15. REGULATORY INFORMATION

HAZARD RATING SYSTEMS:
HMIS (SCALE 0-4, WHERE 4=SEVERE HAZARD): Health: 2 Flammability: 1 Reactivity: 0

INVENTORY STATUS:

FEDERAL REGULATIONS: HAZARDOUS PRODUCT COMPOSITION/CAS NUMBER	APPROX. WEIGHT PERCENT	SARA 313 CHEMICALS	CERCLA/SARA - Section 302 Extremely Haz
Cellulase (fungal) 9012-54-8	10 - 15	Not Listed	Not Listed
Water 7732-18-5	Proprietary	Not Listed	Not Listed
Sorbitol 50-70-4	Proprietary	Not Listed	Not Listed
Sodium Chloride 7647-14-5	Proprietary	Not Listed	Not Listed

STATE REGULATIONS:

California - Prop. 65 - Cancer and Reproductive Listed: NO

List: Listed: NO

MASSACHUSETTS RTK: ANSI US Format

DATE OF MSDS PREPARATION: 01/20/2005

MATERIAL SAFETY DATA SHEET



Genencor International®

Product Name: **SPEZYME® CP**
Product Code: **A03117**

NEW JERSEY RTK:
PENNSYLVANIA RTK:

Listed: NO
Listed: NO

16. OTHER INFORMATION

ADDITIONAL INFORMATION:

The above information is based on data available to us and considered to be accurate. However, NO WARRANTY is expressed or implied regarding the accuracy of this information, the results to be obtained from the use thereof, or the hazards connected with the use of the material. As the information contained herein may be applied under conditions beyond our control and with which we are unfamiliar, we do not assume any responsibility for the results of its use. This information is furnished upon the condition that the persons receiving it shall make their own determinations of the effects, properties and protections which pertain to their particular conditions.

Supersedes date: 12/16/2004

Changes since last date of revision: None.

END OF MSDS

DATE OF MSDS PREPARATION: 01/20/2005

ANSI US Format

Page 5 of 5

C. Actividad Celulasa Spezyme CP

1. Unidades de la actividad enzimática

El procedimiento utilizado mide la actividad de la celulasa en unidades de papel filtro (FPU por sus siglas en inglés) por mililitro de la enzima original.

2. Reactivos y materiales utilizados

- Buffer Citrato 0.05M, pH 4.8.

Se prepararon las siguientes soluciones de citrato buffer A: ácido cítrico 0.1M, B: Citrato de sodio 0.1M. Se usaron 23ml de A + 27ml de B y se diluyeron a 100ml con 50ml de agua desionizada. Esta solución se ajustó a pH 4.8.

- Una banda de papel filtro Whatman No.1, 1.0x60cm (~50mg):

En esta prueba, el papel filtro Whatman No.1 se usó como sustrato. Para un set de experimentos, se prepararon 5 bandas de papel filtro No.1.

- 13x100 tubos de ensayo con tapa roscada:

Para un set de ensayos, se necesitaron 12 tubos.

- Un baño de agua.
- Plancha de calentamiento con agitación.
- La celulasa que va a ser analizada.
- Sistema HPLC (columna Aminex HPX-87H)

3. Procedimiento

3.1. Dilución de la enzima

Se hicieron 4 diluciones de tal forma que más de la mitad liberaran más que 2.0mg de glucosa y la otra mitad menos en las condiciones de reacción. Todas las diluciones de la enzima fueron hechas en buffer citrato, pH 4.8.

3.2. Tubos para la prueba enzimática (4 tubos)

- Se pusieron los papeles filtro en cada tubo.
- Se adicionó 1.0ml 0.05M de buffer Na-citrato, pH 4.8, a cada tubo de ensayo.
- Se equilibró la temperatura de los tubos con buffer y sustrato a 50°C en el baño de agua.
- Se agregaron 0.5ml de enzima, diluídas en buffer citrato.
- Se incubó a 50°C por 60min.
- Se removieron los tubos de ensayo del baño a 50°C y se pusieron en agua bullendo por 10min para parar la reacción enzimática.
- También se sacaron los papel filtro para parar la reacción.

3.3. Blanco y tubos de control (6 tubos)

- Control de la enzima (4 tubos): 1.0ml Buffer Na-citrate 0.05M, pH 4.8+0.5ml de la dilución de la enzima (se preparó un control separado para cada dilución).
- Control del sustrato (1 tubo): 1.5ml de buffer citrato + una banda de papel filtro.
- Blanco del reactivo (1 tubo): 1.5ml de buffer citrato.
- Todos los blancos y controles se incubaron a 50°C durante 60min, y luego se sometieron a ebullición durante 10min junto con los tubos que contenían enzima.

3.4. Estándares de glucosa.

Se preparó una solución de glucosa (4mg/ml) usando buffer citrato. A partir de esta solución se hicieron diluciones para obtener 2 mg/ml, 1 mg/ml, y 0.5 mg/ml. Por último se construyó una curva de calibración para glucosa usando un sistema HPLC (columna HPX-87H).

3.5. Análisis HPLC.

Se sacó cada solución de los tubos destinados a hidrólisis, blancos y control usando una jeringa, luego se filtró cada solución a través de un filtro 0.2µm. Cada solución filtrada fue analizada con HPLC y la cantidad de glucosa liberada en cada tubo se determinó utilizando la curva de calibración.

4. Cálculos

La actividad del papel filtro es definida como:

$$\text{Actividad papel filtro (FPU)} = \frac{0.37}{[\text{enzima}] \text{ para liberar } 2.0\text{mg glucosa}} \text{ unidades /ml}$$

La concentración de la enzima (Tabla A1) en esta ecuación es la concentración de la enzima diluida de la cual 0.5 ml son agregados a la mezcla de prueba. 2.0mg de glucosa en cada mezcla reactiva (1.5ml) es equivalente a 1.33 mg/ml. La concentración de la enzima, la cual habría de liberar exactamente 2.0 mg de glucosa (1.33mg/ml), es determinada a partir de la gráfica de concentración en cada ensayo vs las diluciones de la enzima.

Tabla A1. Actividad enzimática de la celulasa.

Dilución #	Buffer Citrato (ml)	1:30 Enzyme (ml)	Concentración
1	9	1	0.0033
2	8	2	0.0067
3	7	3	0.0100
4	6	4	0.0133

En la Figura A1 se muestra la concentración de glucosa contra dilución de la enzima, la concentración exacta de enzima que libera 2.0mg de glucosa es obtenida de su línea de regresión

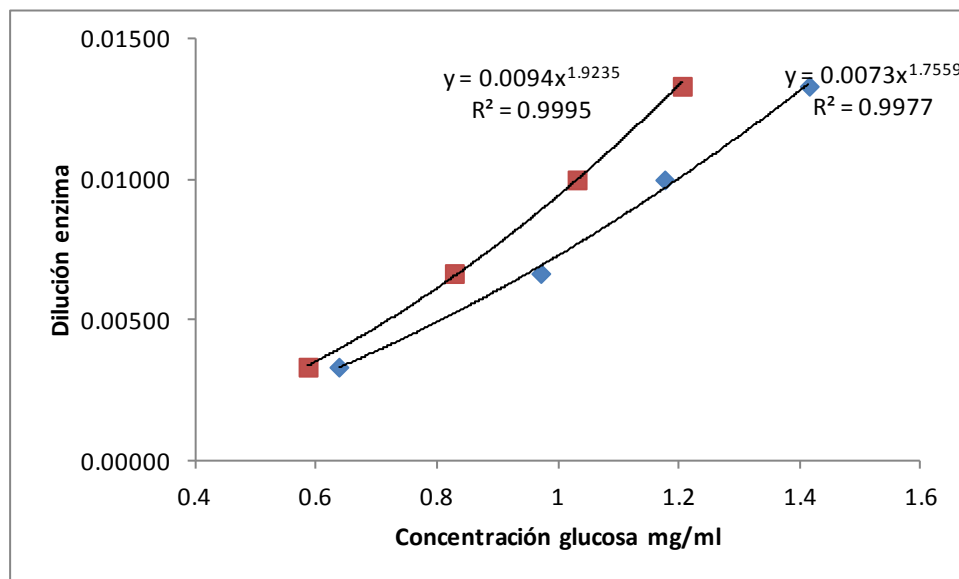


Figura A1. Actividad enzimática de la celulasa.

Como se aprecia en la Figura A1, la actividad se midió por duplicado y es el promedio el que se reporta como actividad. Del lado de los cuadros se obtiene una actividad de 22.63FPU/ml mientras que con los rombos, 30.58FPU/ml cuyo promedio es 26.6 FPU/ml.

Bibliografía

- Baugh, K., & Mccarty, P. L. (1986). Thermochemical Pretreatment of Lignocellulose to Enhance Methane Fermentation: *Biotechnology and bioengineering*, 31(1), 50–61.
- Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M. J., & Castro, E. (2008). Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel*, 87(6), 692–700. doi:10.1016/j.fuel.2007.05.008
- Carrasco, F., & Roy, C. (1992). Kinetic study of dilute-acid prehydrolysis of xylan-containing biomass *. *Wood Science and Technology*, 208.
- Carvalho, F., Duarte, L. C., & Gírio, F. M. (2008). Hemicellulose biorefineries : a review on biomass pretreatments, 67(November), 849–864.
- Castro V., A. A., Rodríguez V., L. I., & Díaz V., J. de J. (2008). Esquemas de reacción para licuefacción y gasificación hidrotérmica de macromoléculas orgánicas. Una revisión. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, XXXII(125), 559–570.
- Chuan-min, Y., Yong-jie, Y., Zheng-wei, R., Ting-chen, L., & Jian-qin, C. (2004). Kinetics of Sawdust Hydrolysis with Dilute Hydrochloric Acid and Ferrous Chloride. *The Chinese Journal of Process Engineering*, (863), 0–4.
- Corredor, D., & Caicedo, L. A. (2005). Modelos matemáticos para reactores biológicos de lecho empacado (PBR): una revisión bibliográfica A bibliographic review of mathematical models of packed-bed biological reactors (PBR). *Revista Ingeniería e Investigación*, 25(3), 101–110.
- Delgenes, J. P., Moletta, R., & Navarro, J. M. (1996). Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(3), 220–225. doi:10.1016/0141-0229(95)00237-5
- Dien, B. S., Ximenes, E. a, O'Bryan, P. J., Moniruzzaman, M., Li, X.-L., Balan, V., ... Cotta, M. a. (2008). Enzyme characterization for hydrolysis of AFEX and liquid hot-water pretreated distillers' grains and their conversion to ethanol. *Bioresource technology*, 99(12), 5216–25. doi:10.1016/j.biortech.2007.09.030

- Donohoe, B. S., Decker, S. R., Tucker, M. P., Himmel, M. E., & Vinzant, T. B. (2008). Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. *Biotechnology and bioengineering*, 101(5), 913–25. doi:10.1002/bit.21959
- Escalante-Hernández, H., Orduz-Prada, J., Zapata-Lesmes, H. J., Cardona-Ruiz, M. C., & Duarte-Ortega, M. (n.d.). *Atlas del Potencial Energético de la Biomasa Residual en Colombia*.
- Gámez, S., González-Cabriaes, J. J., Ramírez, J. A., Garrote, G., & Vásquez, M. (2006). Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of Food Engineering*, 74, 78–88. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.02.005
- Garrote, G., Domí, H., & Parajo, J. C. (2004). KINETICS , CATALYSIS , AND REACTION ENGINEERING Production of Substituted Oligosaccharides by Hydrolytic Processing of Barley Husks. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 1608–1614.
- Girisuta, B., Danon, B., Manurung, R., Janssen, L. P. B. M., & Heeres, H. J. (2008). Experimental and kinetic modelling studies on the acid-catalysed hydrolysis of the water hyacinth plant to levulinic acid. *Bioresource technology*, 99, 8367–8375. doi:10.1016/j.biortech.2008.02.045
- Girisuta, B., Janssen, L. P. B. M., & Heeres, H. J. (2006). GREEN CHEMICALS A Kinetic Study on the Conversion of Glucose to Levulinic Acid. *Chemical Engineering Research and Design*, (May). doi:10.1205/cherd05038
- Girisuta, Buana. (2007). *Levulinic Acid from Lignocellulosic Biomass*.
- Hangos, K., & Cameron, I. (2001). *Process Modelling and Model Analysis* (4th ed.). Academic Press.
- Hosseini, S. A., & Shah, N. (2009a). Multiscale modelling of biomass pretreatment for biofuels production. *Chemical Engineering Research and Design*, 87(9), 1251–1260. doi:10.1016/j.cherd.2009.04.018
- Hosseini, S. A., & Shah, N. (2009b). Multiscale modelling of hydrothermal biomass pretreatment for chip size optimization. *Bioresource technology*, 100(9), 2621–8. doi:10.1016/j.biortech.2008.11.030
- Jing, Q., & Lü, X. (2008). Kinetics of Non-catalyzed Decomposition of Glucose in High-temperature Liquid Water. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 16(6), 890–894. doi:10.1016/S1004-9541(09)60012-4
- Kim, S. B., & Lee, Y. Y. (2002). Diffusion of sulfuric acid within lignocellulosic biomass particles and its impact on dilute-acid pretreatment. *Bioresource technology*, 83(2), 165–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12056493>

- Kim, Y., Kreke, T., & Ladisch, M. R. (2012). Reaction Mechanisms and Kinetics of Xylo-Oligosaccharide Hydrolysis by Dicarboxylic Acids, *00(0)*, 1–12. doi:10.1002/aic
- Kim, Y., Mosier, N. S., Hendrickson, R., Ezeji, T., Blaschek, H., Dien, B., ... Ladisch, M. R. (2008). Composition of corn dry-grind ethanol by-products: DDGS, wet cake, and thin stillage. *Bioresource technology*, *99*(12), 5165–76. doi:10.1016/j.biortech.2007.09.028
- Kim, Y., Mosier, N. S., & Ladisch, M. R. (2008). Effect of Liquid Hot Water Pretreatment on Switchgrass Hydrolysis. Philadelphia: AIChE Meeting.
- Kootstra, a. M. J., Mosier, N. S., Scott, E. L., Beeftink, H. H., & Sanders, J. P. M. (2009). Differential effects of mineral and organic acids on the kinetics of arabinose degradation under lignocellulose pretreatment conditions. *Biochemical Engineering Journal*, *43*(1), 92–97. doi:10.1016/j.bej.2008.09.004
- Kumar, L., Chandra, R., Chung, P. a., & Saddler, J. (2010). Can the same steam pretreatment conditions be used for most softwoods to achieve good, enzymatic hydrolysis and sugar yields? *Bioresource technology*, *101*(20), 7827–33. doi:10.1016/j.biortech.2010.05.023
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *48*(8), 3713–3729. doi:10.1021/ie801542g
- Kumar, R., & Wyman, C. E. (2008). The impact of dilute sulfuric acid on the selectivity of xylooligomer depolymerization to monomers. *Carbohydrate Research*, *343*, 290–300. doi:10.1016/j.carres.2007.10.022
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., & Nilvebrant, N.-O. (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, *24*(3-4), 151–159. doi:10.1016/S0141-0229(98)00101-X
- Lavarack, B. P., Gri, G. J., & Rodman, D. (2002). The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose , arabinose , glucose and other products. *Biomass and Bioenergy*, *23*, 367–380.
- Li, X., Ximenes, E., Kim, Y., Slininger, M., Meilan, R., Ladisch, M., & Chapple, C. (2010). Lignin monomer composition affects Arabidopsis cell-wall degradability after liquid hot water pretreatment. *Biotechnology for biofuels*, *3*, 27. doi:10.1186/1754-6834-3-27
- Ljung, L., & Glad, T. (1994). *Modelling of Dynamic Systems*. New Jersey: Prentice Hall.
- Lloyd, T. a., & Wyman, C. E. (2004). Predicted effects of mineral neutralization and bisulfate formation on hydrogen ion concentration for dilute sulfuric acid

- pretreatment. *Applied biochemistry and biotechnology*, 113-116(1), 1013–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15054249>
- Lu, Y. (2008). *Kinetic and mechanistic studies of a biomimetic catalyst for hemicellulosic biomass hydrolysis* (p. 87). West Lafayette, IN, USA.
- Mestel, R. (2012). Bananas and genetic engineering: Past, present and future. Retrieved from <http://www.latimes.com/news/science/sciencenow/la-sci-sn-banana-genetics-20120712,0,4914046.story>
- Millati, R., Niklasson, C., & Taherzadeh, M. J. (2002). Effect of pH, time and temperature of o v erliming on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by *Saccharomyces cere v isiae*. *Process Biochemistry*, 38, 515–522.
- Mittal, A. (2006). *Kinetics of hemicellulose extraction during autohydrolysis of sugar maple wood*. State University of New York.
- Mittal, A., Chatterjee, S. G., Scott, G. M., & Amidon, T. E. (2009a). Modeling xylan solubilization during autohydrolysis of sugar maple and aspen wood chips: Reaction kinetics and mass transfer. *Chemical Engineering Science*, 64(13), 3031–3041. doi:10.1016/j.ces.2009.03.011
- Mittal, A., Chatterjee, S. G., Scott, G. M., & Amidon, T. E. (2009b). Modeling xylan solubilization during autohydrolysis of sugar maple wood meal: Reaction kinetics. *Holzforschung*, 63(3), 307–314. doi:10.1515/HF.2009.054
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 96, 673–686. doi:10.1016/j.biortech.2004.06.025
- Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2004). Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource technology*, 93(1), 1–10. doi:10.1016/j.biortech.2003.10.005
- Oliva Domínguez, J. M. (2003). *Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre Kluyveromyces marxianus*. Universidad Complutense de Madrid.
- Palmqvist, E. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates . I : inhibition and detoxi cation. *Bioresource technology*, 74.
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1), 25–33. doi:10.1016/S0960-8524(99)00161-3
- Producción anual banana FAO. (2012). Retrieved March 29, 2014, from <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=es>

- Qi, J., & Pel, L. U. X. G. (2007). Kinetics of Non-catalyzed Decomposition of D-xylose in High Temperature Liquid Water *. *Chin. J. Chem. Eng.*, 15(20476089), 666–669.
- Quintana, G., Velásquez, J., Betancourt, S., & Gañán, P. (2009). Binderless fiberboard from steam exploded banana bunch. *Industrial Crops and Products*, 29(1), 60–66. doi:10.1016/j.indcrop.2008.04.007
- Rice, R. G., & Do, D. D. (1995). *Applied Mathematics and Modeling for Chemical Engineers* (1st ed.). Canada: John Wiley & Sons, Inc.
- Rodr, A., Ram, A., Garrote, G., & Manuel, V. (2004). Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid : a kinetic assessment. *Journal of Food Engineering*, 61, 143–152. doi:10.1016/S0260-8774(03)00080-3
- Saeman, J. F. (1945). Kinetics of wood saccharification. Hydrolysis of Cellulose and Decomposition of Sugars in Dilute Acid at High Temperature. *Industrial and Engineering Chemistry*, (9).
- Sánchez, O. J., & Cardona, C. a. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource technology*, 99(13), 5270–95. doi:10.1016/j.biortech.2007.11.013
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2007). Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *ncsu.edu/bioresources*, 2, 472–499.
- Tasić, M. B., Konstantinović, B. V., Lazić, M. L., & Veljković, V. B. (2009). The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. *Biochemical Engineering Journal*, 43(2), 208–211. doi:10.1016/j.bej.2008.09.019
- Tock, J. Y., Lai, C. L., Lee, K. T., Tan, K. T., & Bhatia, S. (2010). Banana biomass as potential renewable energy resource: A Malaysian case study. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 798–805. doi:10.1016/j.rser.2009.10.010
- Velásquez-Arredondo, H. I., Ruiz-Colorado, a. a., & De Oliveira junior, S. (2010). Ethanol production process from banana fruit and its lignocellulosic residues: Energy analysis. *Energy*, 35(7), 3081–3087. doi:10.1016/j.energy.2010.03.052
- Wahlgren, M., & Arnebrant, T. (1991). Protein adsorption to solid surfaces. *Trends in biotechnology*, 9(6), 201–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1367245>
- Wang, K., Jiang, J.-X., Xu, F., & Sun, R.-C. (2009). Influence of steaming explosion time on the physic-chemical properties of cellulose from Lespedeza stalks (Lespedeza cryptobotrya). *Bioresource technology*, 100(21), 5288–94. doi:10.1016/j.biortech.2009.05.019

- Wu, H., Fu, Q., Giles, R., & Bartle, J. (2008). Some Recent Advances in Hydrolysis of Biomass in Hot-Compressed Water and Its Comparisons with Other Hydrolysis Methods. *Energy & Fuels*, 22(1), 190–198. doi:10.1021/ef7002969
- Ya, R., Romani, A., Garrote, G., Alonso, L., & Parajo, J. C. (2009). Processing of *Acacia dealbata* in Aqueous Media : First Step of a Wood Biorefinery. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 6618–6626.
- Zeng, M., Mosier, N. S., Huang, C., & Sherman, D. M. (2007a). Microscopic Examination of Changes of Plant Cell Structure in Corn Stover Due to Hot Water Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis. *Biotechnology and bioengineering*, 97(2), 265–278. doi:10.1002/bit
- Zeng, M., Mosier, N. S., Huang, C., & Sherman, D. M. (2007b). Microscopic Examination of Changes of Plant Cell Structure in Corn Stover Due to Hot Water Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis, 97(2), 265–278. doi:10.1002/bit
- Zhang, P., Whistler, R. L., BeMiller, J. N., & Hamaker, B. R. (2005). Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility—a review. *Carbohydrate Polymers*, 59(4), 443–458. doi:10.1016/j.carbpol.2004.10.014
- Zimbardi, F., Viola, E., Nanna, F., Larocca, E., Cardinale, M., & Barisano, D. (2007). Acid impregnation and steam explosion of corn stover in batch processes. *Industrial Crops and Products*, 26(2), 195–206. doi:10.1016/j.indcrop.2007.03.005
- Zuluaga, R., Putaux, J.-L., Restrepo, A., Mondragon, I., & Gañán, P. (2007). Cellulose microfibrils from banana farming residues: isolation and characterization. *Cellulose*, 14(6), 585–592. doi:10.1007/s10570-007-9118-z